



**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**“REGULACIÓN DE LA S6K POR AUXINAS E INSULINA EN RADÍCULAS DE
SEMILLAS DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN”**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de Maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A

B. E. Julio César Brito Robles.

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Laura J. Pérez Flores.

Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

Dr. Francisco José Fernández Perrino.

México, D. F., a 27 de mayo de 2010.

Comité Tutorial:

Dra. Laura Josefina Pérez Flores. Directora .

Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa.

Dra. Estela Sánchez de Jiménez. Codirectora Externa.

Departamento de Bioquímica Facultad de Química UNAM

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Departamento de Biotecnología UAM-Iztapalapa.

Este trabajo fue realizado en:

El Laboratorio Bioquímica, Fisiología y Biología Molecular de Plantas. Edif. S-253
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está evaluada como posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACyT con número de registro UAMI 309-0 y con la clave C/PFPN-2002-35-32.

Durante el transcurso de mis estudios de Maestría se me otorgaron becas por parte del:

CONACyT con número 192902.

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “REGULACIÓN DE LA S6K POR AUXINAS E INSULINA EN RADÍCULAS DE SEMILLAS DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN” con fecha de examen el 27 de mayo del 2010.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Francisco José Fernández Perrino
PRESIDENTE
Departamento de Biotecnología
UAM- Iztapalapa

Dr. Fernando Díaz de León Sánchez
SECRETARIO
Departamento de Ciencias de la Salud
UAM- Iztapalapa

Dra. Mónica Ponce Valadez
VOCAL
Departamento de Ciencias de la Salud
UAM- Iztapalapa

M. en C. Raúl Aguilar Caballero
VOCAL
Departamento de Bioquímica
Facultad de Química UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura J. Pérez Flore por todo el apoyo y asesorías brindadas.

A la Dra. Estela Sánchez de Jiménez por su valiosa y acertada asesoría.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por su apoyo y todas sus sugerencias y valiosos consejos.

A mis padres, hermanas y familiares por todo su apoyo y motivación.

A Bety, Saraí, Juan Manuel, Xochil y Fulgencio gran parte o todo este trabajo se realizo con su asesoría les agradezco su ayuda y apoyo en todo momento.

A mis amigos por alentarme a seguir siempre adelante.

ÍNDICE	Página
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
I. ANTECEDENTES	17
I.1. SEMILLAS Y GERMINACIÓN.	17
I.1.1 Semillas de maíz.	17
I.1.2 Germinación.	18
I.2. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.	21
I.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.	23
I.3.1 Vía de transducción PI3K-TOR.	26
I.3.1.1 Factores de crecimiento y hormonas.	27
I.3.1.2 Nutrientes.	30
I.3.1.3. La proteína TOR.	31
I.3.1.4. Activación de S6K por fosforilación.	33
I.3.1.5 Procesos celulares regulados por la fosforilación y activación de S6K.	36
I.3.1.6. Fosforilación de la proteína ribosomal S6.	36
I.4. VÍA DE TRANSDUCCIÓN PI3K-TOR EN PLANTAS.	39
I.5. EFECTOS DE LAS AUXINAS Y LA INSULINA EN PLANTAS.	43
I.5.1. Auxinas.	43
I.5.2. Insulina.	46
II. JUSTIFICACIÓN.	49

III. HIPÓTESIS.	50
IV. OBJETIVO GENERAL.	51
IV.1 Objetivos particulares:	51
V. MATERIAL Y METODOS:	52
V.1. Material biológico.	52
V.2. Curva de dosis respuesta con tratamientos continuos de auxinas a distintas concentraciones.	52
V.3. Curva de dosis respuesta con pulsos de dos horas de distintas concentraciones de AIA.	53
V.4. Efecto de la insulina en el crecimiento de la radícula.	53
V.5. Obtención del material biológico para el aislamiento de la enzima S6K y de la proteína PRS6.	53
V.6. Extracción de la proteína ZmS6K.	54
V.7. Separación de la proteína ZmS6K por cromatografía de afinidad.	54
V.8. Extracción de la proteína ribosomal S6.	55
V.9. Separación de la proteína ribosomal S6 por cromatografía de afinidad.	56
V.10. Análisis de las formas fosforiladas de ZmS6K y PRS6 en radícula de maíz.	56
V.11. Determinación de la cinética de la ZmS6K.	57
V.12. Análisis Estadístico.	58
VI. RESULTADOS.	59
VI.1. Curva de dosis respuesta con tratamientos continuos a distintas concentraciones de auxinas.	59

VI.2. Curva de dosis respuesta con pulso de dos horas a distintas concentraciones de auxinas.	60
VI.3. Crecimiento de radículas de maíz en respuesta a un pulso de insulina (200 μU/mL).	61
VI.4. Aislamiento de la proteína ZmS6K de radículas de maíz.	62
VI.5. Efecto de insulina y AIA en la fosforilación de ZmS6K en radículas de maíz.	62
VI.6. Análisis de las formas fosforiladas de ZmS6K en radículas de maíz.	63
VI.7. Análisis cinético de la actividad de la ZmS6K.	65
VI.8. Efecto de insulina y AIA en la fosforilación de ZmPRS6.	68
VI.9. Análisis de las formas fosforiladas de la proteína ribosomal S6 en radículas de maíz.	69
VII. DISCUSIÓN.	72
VIII. CONCLUSIONES.	78
IX. BIBLIOGRAFÍA.	80

ABREVIATURAS

α -ANA	Ácido α naftalén acético
AIA	Ácido indol acético
AMP	Adenosín monofosfato
ARN _m	Ácido ribonucleico mensajero
ARN _t	Ácido ribonucleico de transferencia
ARN _r	Ácido ribonucleico ribosomal
AtTOR	Proteína blanco de rapamicina de <i>Arabidopsis thaliana</i> (por sus siglas en inglés, target of rapamycin)
BCL-2	Linfoma de las células B 2 (por sus siglas en inglés, B cell lymphoma 2)
CHAPS	Ácido 3-[(3-colamido propilo) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DICAMBA	Ácido 3,6-dicloro-o-anísico
DTT	1-4 Ditiotreitól
EDTA	Ácido etilén diamino tetra acético
EGTA	Ácido etilénglicol tetra acético
eIF	Factor de iniciación de la traducción de eucariontes
eIF4B	Factor de iniciación de la traducción 4B de eucariontes
eEF	Factor de elongación de la traducción de eucariontes
eEF2K	Factor de elongación de la traducción 2K de eucariontes
eRF	Factor de terminación de la traducción de eucariontes
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares (por sus siglas en inglés, extracellular signal-regulated kinases)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés, epidermal growth factor)
4EBP1	Proteína de unión 1 del factor de iniciación de la traducción 4E de eucariontes
FKBP12	Proteína de unión FK506 (por sus siglas en inglés, FK506 binding protein 12)
FYVE	Dominio Fab1/YOTB/2K632.12/Vac1/EEA1

GEF	Factor de intercambio de guanosín nucleótidos (por sus siglas en inglés, guanosin nucleotide exchange factor)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacín etanosulfónico
HsTOR	Proteína blanco de rapamicina humana (por sus siglas en inglés, Homo sapiens target of rapamycin)
IEF	Isoelectroenfoque (por sus siglas en inglés, isoelectric focusing)
IGF	Factores de crecimiento semejantes a insulina (por sus siglas en inglés, insuline like growth factor)
IRS	Receptor de insulina
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos (por sus siglas en inglés, mitogen activated protein kinases)
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mTOR	Proteína blanco de rapamicina de mamíferos (por sus siglas en inglés, mammalian target of rapamycin)
MS	Medio Murashige y Skoog
NLS	Señal de localización nuclear
PA	Ácido fosfatídico
PDCD4	Proteína de muerte celular programada 4 (por sus siglas en inglés, programmed cell death protein 4)
PDGF	Factores de crecimiento derivados de plaquetas (por sus siglas en inglés, platelet derived growth factor)
PDK1	Cinasa 1 dependiente de fosfoinositidos
PIKKS	Cinasas relacionadas con la cinasa de fosfoinosítidos (por sus siglas en inglés, phosphoinositide-3-OH-kinase-related kinases)
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PIP2	Fosfatidil inositol bifosfato
PIP3	Fosfatidil inositol trifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKB	Proteína cinasa B (también llamada Akt)
PKC	Proteína cinasa C

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRS6	Proteína ribosomal S6
PTEN	Fosfatasa y homólogo de tensina en el cromosoma 10 (por sus siglas en inglés, phosphatase and tensin homolog on chromosome 10)
PVPP	Polivinil polipirrolidona
PX	Dominio de homología con Phox
Raptor	Proteína regulatoria asociada a TOR (por sus siglas en inglés, regulatory associated protein TOR)
Ras	Proteína GTPasa interruptora
Rheb	Proteína GTPasa pequeña (por sus siglas en inglés, Ras homologue enriched in brain)
Rictor	Proteína insensible a rapamicina acompañante de TOR (por sus siglas en inglés, rapamycin-insensitive companion of TOR)
RSK	Péptido sintético que contiene los sitios fosforilables de la S6
SAURs	ARNs pequeños estimulados por auxinas (por sus siglas en inglés, Small Auxin-up RNAs)
TOP	Segmento de oligopirimidinas (por sus siglas en inglés, tract of oligopyrimidine)
TORC1	Complejo multiproteico 1 con TOR en el que participa Raptor
TORC2	Complejo multiproteico 2 con TOR en el que participa Rictor
TOS	Motivo de señalización de TOR (por sus siglas en inglés, TOR signaling motif)
TSC1	Proteína supresora del complejo esclerosis tuberosa 1
TSC2	Proteína supresora del complejo esclerosis tuberosa 2
3', 5'UTR	Regiones 3' y 5' no traducibles (por sus siglas en inglés, 3', 5' untranslated regions)
PS6	Proteína ribosomal S6
S6K	Cinasa de la proteína ribosomal S6
ZmPRS6	Proteína ribosomal S6 de maíz
ZmS6K	Cinasa de la proteína ribosomal S6 de maíz

ZmTOR Proteína blanco de rapamicina de maíz (por sus siglas en inglés, Zea maize target of rapamycin)

“REGULACIÓN DE LA S6K POR AUXINAS E INSULINA EN RADÍCULAS DE SEMILLAS DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN”

RESUMEN

La germinación comienza con la imbibición de las semillas, durante este proceso las semillas pasan de un estado quiescente a un estado metabólicamente activo. Entre los procesos metabólicos que se reinician durante la germinación se encuentra la síntesis de proteínas, que en etapas tempranas de imbibición está basada en la traducción de ARN_m almacenados en las semillas y en etapas posteriores requiere de la transcripción de nuevos ARN_m y su posterior traducción.

Las auxinas y la insulina promueven el crecimiento de ejes embrionarios de semillas de maíz durante la germinación. A nivel molecular, estos efectores inducen en ejes embrionarios de maíz la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (PRS6) de la subunidad 40S, que se encuentra en la región de unión del ARN_m al ribosoma. Esta proteína presenta varios residuos susceptibles de ser fosforilados en respuesta a distintas señales. La fosforilación de la PRS6 se lleva a cabo por la cinasa S6K y reportes previos indican que la fosforilación de PRS6 por auxinas o insulina forma parte, al parecer, de una vía de regulación traduccional de la síntesis de proteínas. La insulina y los factores semejantes a insulina regulan el crecimiento a través de la vía de transducción PI3K-TOR. En plantas se ha reportado la existencia de varios componentes de esta vía de transducción.

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo, se observó que las auxinas y la insulina inducían el crecimiento de la parte aérea de ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Al igual que en ejes embrionarios completos, ambos efectores indujeron la fosforilación de la PRS6, lo que sugería el posible entrecruzamiento de sus vías de señalización. Sin embargo, se encontró que el tipo de fosforilación de PRS6 y los patrones de proteínas sintetizadas en la parte aérea

de ejes embrionarios de maíz en respuesta a auxinas o insulina son distintos. Estos resultados apoyan la existencia de diferentes mecanismos de acción para estos efectores.

Por ello, se decidió profundizar en el estudio del mecanismo de acción de las auxinas y de la insulina, y en los efectos de estas hormonas sobre la fosforilación de la cinasa S6K y de la PRS6 en radículas de semillas de maíz en germinación. Los resultados del presente trabajo indican que las auxinas y la insulina indujeron el crecimiento de las radículas, aunque el crecimiento fue ligeramente superior con insulina. Ambos efectores indujeron una mayor fosforilación de la enzima ZmS6K y de su sustrato ZmPRS6. El aumento en la fosforilación de la cinasa se reflejó en su activación, como se observa por el incremento de la $V_{max_{ap}}$. Sin embargo, los patrones de formas fosforiladas de S6K y de PRS6 difieren con cada efector y también difieren de los observados en la parte aérea de los ejes embrionarios. Estos resultados sugieren que los efectores auxina e insulina, aunque comparten algunos intermediarios, no producen los mismos efectos, por lo que es probable que sus vías de transducción sean distintas. Asimismo, los resultados indican que la respuesta a estos efectores es tejido-específica.

“REGULATION OF S6K BY AUXINS AND INSULIN IN RADICLES OF MAIZE SEEDS DURING GERMINATION”

ABSTRACT

Germination starts with seed imbibition; during this process, seeds emerge from a quiescent state to a metabolic active state. One of the metabolic processes that restart during germination is the protein synthesis, which in early stages of the imbibition consists in the translation of mRNA stored in the seed and later, it requires the transcription of new mRNA with its subsequent translation.

Auxins and insulin promote growth in maize embryonic axis during germination. At a molecular level, these effectors induce phosphorylation of S6 ribosomal protein (S6rp), localized in the mRNA binding region of the 40S subunit of the ribosome. This protein contains several residues susceptible to phosphorylation in response to different signals. S6rp phosphorylation is performed by the kinase S6K. Previous reports show that auxins or insulin-induced S6rp phosphorylation is part of a translational regulation pathway of protein synthesis. In animals, insulin and insulin-like factors regulate growth through the translational regulation pathway PI3K-TOR. In plants, the existence of several of the components of this transduction pathway has been reported.

Previous studies from our lab group showed that auxins and insulin induced growth of the aerial part of maize embryonic axis during germination. Also, like in the complete embryonic axis, both effectors induced S6rp phosphorylation, which suggested a cross-talk between their transduction pathways. However, the kind of S6rp phosphorylation and the patterns of synthesized proteins in the aerial part in response to auxins or insulin are different. These results support the existence of different mechanisms of action for these effectors. Because of this, it is interesting to study in

depth the mechanism of action of auxins and insulin and the effect of these hormones on S6K and S6rp phosphorylation in radicles of maize seed during germination.

The results from the present work showed that both, auxins and insulin induce radicle growth, although, the induction was slightly higher with insulin. Both effectors induced a higher phosphorylation of the enzyme ZmS6K and its substrate ZmS6rp. The increase in the kinase phosphorylation resulted in its activation as observed by an increase in the $V_{max_{ap}}$. However, the patterns of S6K and S6rp phosphorylated forms were different for each effector and differed from those observed in the aerial part of the embryonic axis. These results showed that even though, the effectors auxin and insulin share some intermediates, they do not produce the same effects, suggesting the possibility that their transduction pathways are different. Furthermore, the results indicate that response to these effectors is tissue-specific.

I. ANTECEDENTES

I.1. SEMILLAS Y GERMINACIÓN.

Las semillas son de fundamental importancia para la alimentación humana. Los granos de cereales comprenden el 90% de todas las semillas cultivadas y contribuyen a la mitad del abastecimiento de energía por persona. Las semillas contienen al embrión y están estructural y fisiológicamente equipadas para funcionar como unidades de dispersión. Contienen además reservas alimenticias para sostener al embrión hasta que se ha desarrollado en una plántula en desarrollo y se establezca como organismo autótrofo (Bewley, 1997).

I.1.1 Semillas de maíz.

El maíz, junto con el trigo y el arroz, se encuentran entre los cereales más importantes del mundo, que suministran elementos nutritivos a los seres humanos. Botánicamente, el maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual dotada de un amplio sistema radicular fibroso.

El grano de maíz se denomina en botánica cariósida o cariopsis; cada grano contiene el revestimiento de la semilla, o cubierta seminal, y la semilla (Bewley y Black, 1994).

El desarrollo de la planta de maíz se puede dividir en las etapas vegetativa, transicional, reproductiva y de semilla. En la etapa vegetativa se desarrollan y diferencian distintos tejidos. La etapa reproductiva, se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas, que se diferenciarán en espigas y granos (Jugenheimer, 1988).

I.1.2 Germinación.

La germinación de la semilla se define como la transición de un embrión, en estado quiescente, que se ha desarrollado de un óvulo fertilizado, en una nueva planta fotosintéticamente activa. La germinación resulta de la combinación de múltiples eventos celulares y metabólicos, coordinados por una compleja red de regulación que incluye la latencia de las semillas, que es una capacidad intrínseca de bloquear temporalmente el alargamiento de la radícula para optimizar el periodo de germinación (Bewley, 1997).

El proceso de germinación comienza con la imbibición de la semilla madura deshidratada quiescente y termina con el alargamiento del eje embrionario, generalmente la radícula, y su protrusión a través de las estructuras que rodean al embrión (testa) (Bewley, 1997).

La germinación de las semillas se afecta tanto por factores ambientales, tales como la disponibilidad de agua, oxígeno, luz y una temperatura apropiada, como por factores intrínsecos como la latencia de las semillas, establecida por la permeabilidad de la testa al agua y al oxígeno y la obstrucción de la emergencia de la radícula por la testa (Bove y col., 2001).

En las semillas secas quiescentes la incorporación de agua se lleva a cabo en tres fases; la captación inicial de agua (fase I), seguida por una etapa en la que casi no se incrementa la captación de agua (fase II) y un posterior incremento en la captación de agua que se lleva a cabo sólo después de que la germinación se ha completado, cuando los ejes embrionarios crecen (fase III) (Bewley, 1997).

En la figura 1 se señalan los eventos que suceden durante la imbibición de la semilla. En la fase I se observa una captación rápida de agua conocida como imbibición física. Durante esta fase se inicia la reactivación metabólica, resultado del gradual

incremento del contenido de agua. En la fase II, la velocidad de hidratación disminuye y se dan nuevos mecanismos fisiológicos que preparan la expansión celular: en las células de los ejes embrionarios se acumulan sustancias osmóticamente activas, como solutos, azúcares, aminoácidos, iones potasio, etc., favoreciendo la captación de agua y, por otro lado, la acidificación de la pared celular induce la ruptura de los enlaces entre los polímeros de la pared (relajamiento de la pared celular). Estos eventos coinciden con la activación de la ATPasa de H⁺ en el plasmalema, lo que se traduce en un incremento posterior de la captación de agua que puede coincidir con el debilitamiento de los tejidos que envuelven al embrión (endospermo); de esta forma, los ejes embrionarios se alargan y se completa la germinación (Bove y col., 2001).

Con la imbibición, la semilla seca quiescente reanuda rápidamente su actividad metabólica. Generalmente se asume que las enzimas, estructuras y organelos necesarios para la reanudación de la actividad metabólica están presentes en la semilla quiescente, permaneciendo almacenados durante la desecación etapa con la que finaliza la maduración de la semilla. La reintroducción de agua durante la imbibición es suficiente para reanudar las actividades metabólicas (Bewley, 1997).

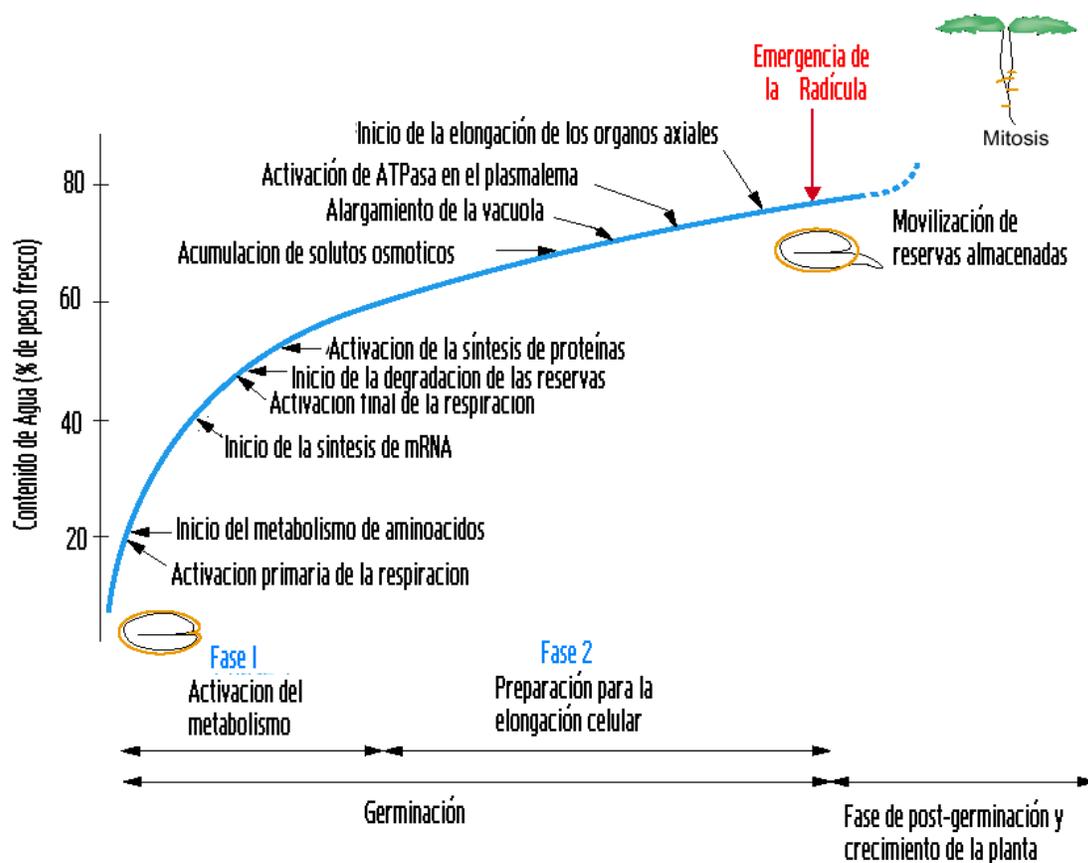


Figura 1. Eventos metabólicos que ocurren durante la captación de agua o imbibición de las semillas (Bove y col., 2001)

Todos los componentes para la reanudación de la síntesis de proteínas en la imbibición están presentes en las células de los embriones secos maduros, aunque los polisomas están ausentes. Sin embargo, a los pocos minutos de rehidratación existe una disminución en el número de ribosomas libres, ya que éstos son reclutados en los complejos de polisomas sintetizadores de proteínas. La síntesis inicial de proteínas depende de los ribosomas y ARNm almacenados, aunque nuevos ribosomas y ARNm se sintetizarán en etapas posteriores (Bewley, 1997).

I.2. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.

La síntesis de proteínas es un proceso celular que requiere gran cantidad de energía, por lo que su regulación está acoplada al estado metabólico de las células (Rutter y *col.*, 2002; Proud, 2007a). En este sentido, se han observado cambios rápidos en la velocidad de la traducción durante la mitosis, en respuesta a distintos tipos de estrés, a tratamientos con hormonas, mitógenos y factores de crecimiento y a nutrientes (Hershey, 1989; Meyuhas, 2000).

La síntesis de proteínas se lleva a cabo en los ribosomas, que son complejos de ribonucleoproteínas, de aproximadamente 2.4 a 4.5 MDa. En eucariontes, los ribosomas están formados por dos subunidades, denominadas 40S (subunidad menor) y 60S (subunidad mayor) debido a su coeficiente de sedimentación. La composición interna y su tamaño macromolecular varía entre distintos organismos, aunque ambas subunidades están compuestas por ARNr y proteínas. El ribosoma de mamíferos contiene 80 proteínas ribosomales en sus dos subunidades (Wool y *col.*, 1995). La subunidad pequeña comprende una sola molécula de ARN, denominada ARNr 18S y 33 proteínas; en contraste la subunidad mayor está formada por tres moléculas de ARNr, denominadas ARNr 5S, 5.8S y 28S, y de 46 a 47 proteínas. Se ha reportado que algunas proteínas ribosomales pueden tener algunas funciones extrarribosomales (Wool, 1996; Carroll y *col.*, 2008). El ribosoma tiene una naturaleza dinámica, ya que los ácidos nucleicos y las proteínas de las subunidades cambian conforme la traducción progresa y los componentes proteicos individuales se asocian o disocian del complejo (Bailey-Serres, 1999; McIntosh y Bonham-Smith, 2006; Proud, 2007a).

El proceso de traducción puede dividirse convencionalmente en tres etapas (Bailey-Serres, 1999; Lewin, 2000; Meyuhas, 2000; McIntosh y Bonham-Smith, 2006; Proud, 2007a):

- a. La etapa de iniciación, que comprende la formación del complejo activo de iniciación, en donde el ARNm y el ARN de transferencia para la metionina ($\text{ARNt}_{\text{m}}^{\text{Met}}$) son reclutados hacia el ribosoma, inicialmente hacia la subunidad pequeña 40S (Bailey-Serres, 1999; Meyuhas, 2000; Proud, 2007a).
- b. La etapa de elongación, que involucra la formación de la unión peptídica entre dos aminoácidos. El codón de iniciación es localizado por un proceso conocido como escaneo, durante el cual es reconocido por el anticodón de $\text{ARNt}_{\text{m}}^{\text{Met}}$. A continuación se da el ensamblaje del ribosoma 80S completo en el codón de inicio, listo para proceder al alargamiento del nuevo polipéptido (Bailey-Serres, 1999; Meyuhas, 2000; Proud, 2007a).
- c. La etapa de terminación, que involucra el reconocimiento del triplete de terminación del ARNm en el extremo 3' por el complejo formado por el ribosoma y los correspondientes factores de terminación. Este complejo cesa la traducción y provoca el desprendimiento de la cadena de polipéptidos recién formada (Bailey-Serres, 1999; Lewin, 2000; Proud, 2007a).

Los ribosomas de plantas tienen una arquitectura similar a la de los mamíferos. Las proteínas ribosomales de varias especies de plantas superiores están conservadas tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Bailey-Serres, 1999; McIntosh y Bonham-Smith, 2006). Estudios recientes de ribosomas citoplásmicos de plantas revelaron que éstos son ligeramente más pequeños que los encontrados en mamíferos, debido aparentemente a una menor masa de la subunidad 60S. Diversos análisis bioquímicos, utilizando técnicas tales como la electroforesis en geles bidimensionales de las proteínas que componen los ribosomas de plantas monocotiledóneas (trigo, cebada y maíz) y dicotiledóneas (soya, tomate y tabaco),

han servido para determinar la cantidad de proteínas de los ribosomas vegetales. Los ribosomas citoplásmicos de plantas contienen de 75 a 92 proteínas, dependiendo de la especie. Los resultados de estos geles revelaron que la subunidad 40S contenía más de 40 proteínas, mientras que la subunidad 60S contenía más de 59 proteínas. Por otra parte, en una investigación del genoma completo de *Arabidopsis*, se lograron identificar 80 posibles proteínas ribosomales en el citoplasma, utilizando secuencias conocidas de proteínas ribosomales homólogas de rata (Bailey-Serres, 1999; Barakat y col., 2001; Carroll y col., 2008).

I.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.

La traducción es un proceso complejo que integra interacciones entre señales extracelulares, la maquinaria celular y el material genético (Brant-Zawadzki y col., 2007)

El control traduccional se define como el cambio en la eficiencia o en la tasa de traducción de uno o más ARNm, lo que da como resultado un cambio en el tipo y en el número de proteínas sintetizadas en un tiempo determinado. La regulación de la tasa total de la síntesis de proteínas es importante para la modulación del metabolismo celular y de los tejidos (Proud, 2007a).

La regulación de la síntesis de proteínas, permite a las células separar temporalmente los mecanismos de traducción y transcripción, y provee mecanismos para una regulación más rápida de la síntesis de proteínas en respuesta a las señales del ambiente que si dicha respuesta requiriera mecanismos de regulación transcripcional y traduccional (Brant-Zawadzki y col., 2007).

El control de la expresión genética a nivel traduccional es un control de respuesta rápida y reversible; que permite un ajuste fino en la cantidad de proteínas sintetizadas, así como la regulación coordinada de familias de proteínas y la

regulación de sistemas que carecen de un mecanismo de control transcripcional, especialmente en el caso de células animales sin núcleo (Mathews y *col.*, 2000; Gingras y *col.*, 2001).

En las células eucariontes, el principal paso limitante de la traducción es la iniciación, controlada por un conjunto de proteínas que responden a cascadas de señalización activadas por señales extracelulares. (Hershey, 1989; Dever, 2002). Dentro del complicado esquema de la síntesis de proteínas hay muchos sitios posibles sobre los cuales se puede ejercer el control traduccional: se han reportado mecanismos que encienden o apagan la síntesis de proteínas en general, aunque hay otros mecanismos que introducen selectividad al proceso (Jefferies y Thomas, 1996; Sánchez de Jiménez, 2000).

El control traduccional global regula procesos generales necesarios para la traducción de los ARNm, y por lo tanto afecta las tasas de traducción de todas las clases de transcritos. El control global es sensible a la disponibilidad de materias primas, como aminoácidos o energía, que son los responsables del decremento total de la síntesis de proteínas que ocurre, por ejemplo, durante la carencia de nutrientes. Por otra parte, el control selectivo actúa sobre moléculas de ARNm con características específicas (Joshi-Barve y *col.*, 1992).

Los mecanismos regulatorios a nivel traduccional están fundamentalmente relacionados con cambios rápidos (minutos) en la actividad o asociación de componentes de la maquinaria traduccional, que son principalmente regulados por cambios en los estados de fosforilación de algunos componentes. A largo plazo (horas a días), el control de la síntesis de proteínas está relacionado con los niveles celulares de los factores de traducción y ribosomas (Meyuhas, 2000; Proud, 2007a).

Los beneficios de controlar la expresión genética a nivel traduccional pueden ser resumidos en términos de rapidez, precisión, reversibilidad y redundancia. La rapidez

permite a una célula cambiar su función/fenotipo en respuesta a algún estímulo. El control traduccional ofrece precisión en la regulación de la expresión genética al permitir ajustar cambios pequeños y rápidos en los niveles totales de proteínas. Otra ventaja de la regulación traduccional es la naturaleza reversible de la respuesta a condiciones fisiológicas alteradas. La combinación del control transcripcional y traduccional (redundancia) ayuda a evitar la expresión desregulada de moléculas potencialmente dañinas (Kozak, 1991; Meyuhas, 2000).

Después de la transcripción, procesamiento y exportación del núcleo hacia el citoplasma, el ARNm está listo para la traducción, proceso en el que el ARNm es reclutado por los ribosomas y en el que participan un gran número de factores eucarióticos de iniciación de la traducción (eIFs) (Kozak, 1999; Shah *y col.*, 2000).

La eficiencia de traducción de un ARNm depende de elementos estructurales no traducibles de sus regiones 5'UTR y 3'UTR (regiones 5' y 3' no traducidas), así como de la disponibilidad y actividad de los factores que reconocen estas estructuras (Gingras *y col.*, 1999).

La síntesis de las proteínas que integran la maquinaria traduccional (proteínas ribosomales, factores de traducción, etc.), depende tanto de la maquinaria de traducción como de la cantidad y estructura de los ARNm. Los ARNm que codifican para la gran mayoría de las proteínas ribosomales y factores de traducción exhiben como característica estructural definida una secuencia rica en pirimidinas llamada TOP (secuencia de oligopirimidinas), ubicada a continuación de la estructura 5' CAP (Meyuhas y Horstein, 2000). Algunos autores sugieren que este tipo de secuencias puede conferir selectividad traduccional a los mensajes, en respuesta a diversos estímulos como mitógenos (Shah *y col.*, 2000) y/o factores nutricionales (Meyuhas y Horstein, 2000; Proud, 2002).

La fosforilación de las proteínas ribosomales y factores de traducción es un fenómeno generalizado en células animales y vegetales. Diversos reportes indican

que la fosforilación, tanto de las proteínas ribosomales, como de los factores de iniciación y elongación, participa en el control de la traducción de los ARNm en eucariontes (Hershey, 1989; Pérez y *col.*, 1993; Sánchez de Jiménez y *col.*, 1997; Reyes de la Cruz y *col.*, 2004). Entre las proteínas ribosomales y factores de traducción que se fosforilan se encuentran la proteína ribosomal S6 (PRS6), la proteína de unión 4EBP1, el factor de elongación eEF2 y el factor de iniciación eIF4B (Wang y Proud, 2006; Hayashi y Proud, 2007).

Sin embargo, la síntesis de proteínas en plantas presenta algunas diferencias importantes con respecto a los sistemas animales. En radículas de maíz se encontró que las condiciones de hipoxia incrementan la fosforilación de una de las isoformas de eIF4A. Al parecer, la fosforilación de este factor está relacionada con la inhibición general de la traducción en respuesta a este mecanismo de estrés (Webster y *col.*, 1991). Aunque la hipoxia inhibe la traducción de la mayoría de los ARNm, hay un grupo de ARNm que escapa a esta represión traduccional (Branco-Price y *col.*, 2008). En estudios recientes se ha encontrado que el factor eIF4A-III se relocaliza en el núcleo en respuesta a hipoxia (Koroleva y *col.*, 2009). En plantas existe una isoforma eIF-iso 4F que no se ha localizado en otros eucariontes (Metz y Browning, 1996) y una isoforma del factor eIF4E, denominada eIF-iso 4E (Dinkova y *col.*, 2000). El mecanismo de regulación de la actividad de las isoformas de eIF4E no se conoce, ya que al parecer no hay homólogos de las proteínas de unión a este factor 4E-BP en plantas (Dinkova y *col.*, 2000). En años recientes se ha reportado que la lipoxigenasa 2 puede unirse a los factores eIF4E y eIF-iso 4E y conserva un motivo presente en varias proteínas 4E-BP (Freire y *col.*, 2000).

I.3.1 Vía de transducción PI3K-TOR.

Desde hace mucho tiempo se ha reportado la fosforilación de factores de transcripción, traducción y de proteínas ribosomales como un mecanismo para asegurar cambios rápidos y de largo plazo en la expresión genética en respuesta a cambios ambientales. En particular, se ha demostrado la fosforilación de la PRS6 en células eucariontes en respuesta a factores de crecimiento, mitógenos y nutrientes (Thomas y *col.*, 1982., Hara y *col.*, 1998).

El crecimiento celular (incremento en masa celular y tamaño) es un prerrequisito para la proliferación o incremento en el número de células (Hannan y *col.*, 2003; Wullschleger y *col.*, 2006). El crecimiento y la proliferación celular requieren de una coordinación entre las señales estimuladoras provenientes de los nutrientes y de los factores de crecimiento y hormonas (Wullschleger y *col.*, 2006).

I.3.1.1 Factores de crecimiento y hormonas.

Los receptores para la insulina y para los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) son miembros de una superfamilia de receptores tipo cinasa de tirosina. Estos receptores se activan con la unión de insulina o IGFs, induciendo su actividad intrínseca de cinasa de tirosina e iniciando la transducción de la señal. La señal originada por la interacción hormona/factor de crecimiento-receptor es internalizada a la célula, a través de una cascada de reacciones de fosforilación que involucran diferentes cinasas y la producción de metabolitos específicos que funcionan como segundos mensajeros. Entre las cinasas involucradas se encuentran la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K), la proteína cinasa B (PKB), cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) y las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), responsables de diversos efectos en el crecimiento, tales como el incremento en la división celular, en el tamaño celular, en la síntesis de proteínas, en la migración

celular y en la inhibición de la apoptosis (Imai y Clemmons, 1999; Peruzzi y col., 1999).

La figura 2 muestra como la unión de la insulina a su receptor resulta en la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina y en la fosforilación de tirosinas de los sustratos del receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) por la tirosina cinasa del receptor de insulina. Esto permite la asociación de los IRSs con la subunidad regulatoria de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) (Bevan, 2001).

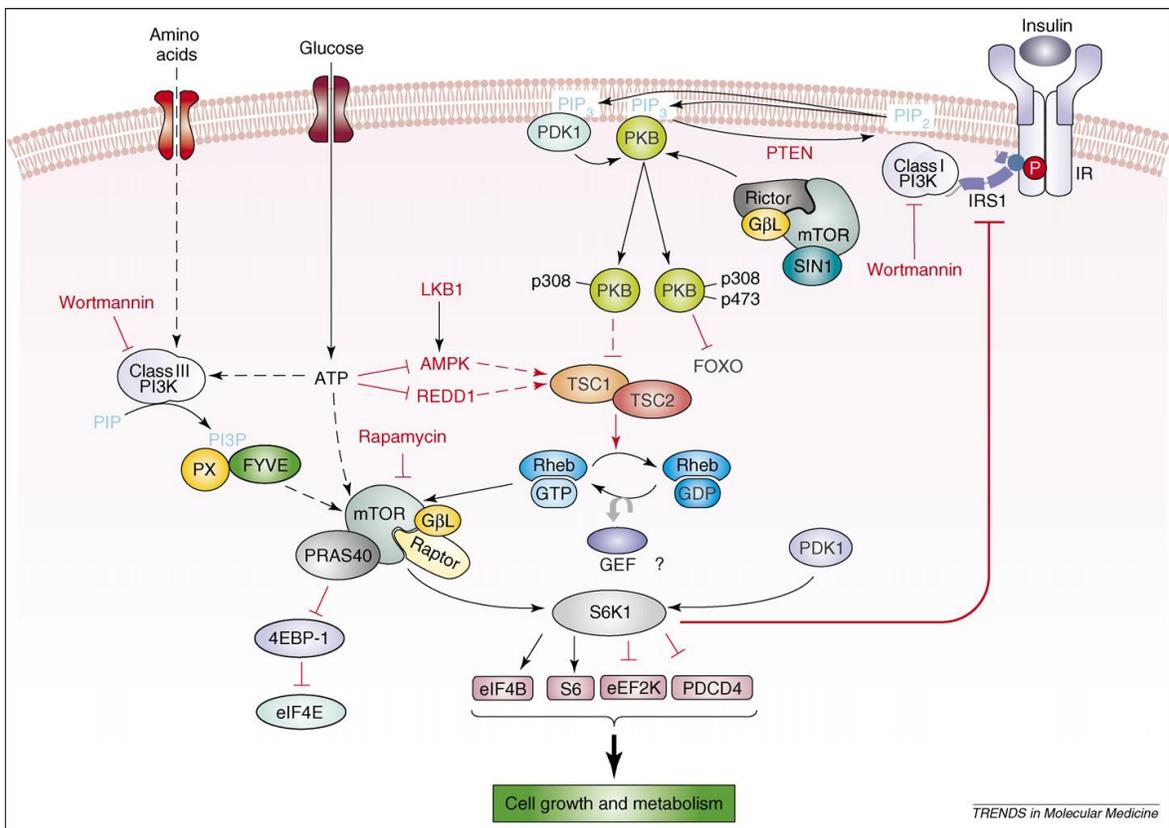


Figura 2. Vía PI3K-Complejo1 mTOR-S6K. La proteína mTOR existe en dos complejos estructurales distintos. El complejo 1 mTOR, que contiene a Raptor, es regulado por efectores que incluyen aminoácidos, ATP e insulina, los cuales inician diversas cascadas de señalización (las flechas discontinuas indican incertidumbre en los mecanismos involucrados). Estudios recientes indican que el Complejo 2 mTOR no se encuentra río arriba del complejo 1 mTOR. La fosforilación de S6K1 por el complejo 1 mTOR permite a PDK1 fosforilar y activar a S6K1.

En la figura 2 se observa también como los factores de crecimiento y las hormonas como la insulina regulan al complejo 1 mTOR a través de la vía de señalización de PI3K clase I. En la membrana, la PI3K clase I produce el segundo mensajero fosfatidil inositol (3, 4, 5)- trifosfato [PtdIns (3, 4, 5)P₃], el cual se une al dominio PH de las proteínas blanco PKB (también conocidas como Akt) y a la PDK1. La unión de [PtdIns (3, 4, 5)P₃] al dominio PH de PKB/Akt recluta a esta cinasa a la membrana celular, donde es activada a través de la fosforilación concertada por PDK1 en la posición Tre³⁰⁸ y por el complejo 2 mTOR en el residuo Ser⁴⁷³. El principal regulador negativo de este paso parece ser la fosfatasa PTEN. PTEN convierte [PtdIns (3, 4, 5)P₃] en [PtdIns (4, 5)P₂]. A su vez, la PKB/Akt activada tiene varios sustratos, incluyendo la glucógeno sintasa, factores de transcripción y la proteína 2 de esclerosis tuberosa (TSC2) del complejo TSC1-TSC2, que actúa como un complejo supresor de tumor. La fosforilación de TSC2 resulta en la disociación y degradación del complejo TSC1-TSC2, liberando la GTPasa homóloga de RAS (denominada Rheb), y permitiéndole alcanzar el estado activo (unión a GTP), lo que facilita a su vez la transmisión de la señal del complejo 1 mTOR a sus sustratos, ya sea a través de la activación directa del complejo 1 mTOR o de su movilización a un compartimento celular (Dann y *col*, 2007). Entre los sustratos de este complejo se encuentran 4E-BP1 y S6K. El complejo 1 mTOR fosforila e inhibe a 4E-BP1, liberando de la represión al factor eIF4E y activando la síntesis de proteínas y la progresión del ciclo celular. En paralelo, el complejo 1 mTOR y PDK1 activan a la cinasa S6K1, que está involucrada en la regulación de la síntesis de proteínas, tamaño celular, progresión del ciclo celular y homeostasis de la glucosa (Li y *col.*, 2004; Long y *col.*, 2005; Ruvinsky y Meyuhas, 2006). La vía de señalización PI3K clase I-PKB también es activada por otros factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Una vez activada PKB a través de estas vías, puede mediar la fosforilación de varios sustratos específicos, como los descritos anteriormente, además de la caspasa 9 y la proteína antagonista de muerte celular BCL-2, culminando en la respuesta de

sobrevivencia. Aunque la activación del complejo 1 mTOR está involucrada en esta respuesta, la actividad cinasa de este complejo no puede ser disparada por la PI3K clase I en ausencia de nutrientes o energía celular (Dann y *col.*, 2007).

I.3.1.2 Nutrientes.

El estudio del papel de los nutrientes, específicamente los aminoácidos, reveló la existencia de una nueva cascada de señalización que activa el complejo 1 mTOR. En estudios previos se encontró que la inducción de la fosforilación de S6K1 y 4EBP1 por aminoácidos, especialmente el aminoácido ramificado leucina, depende del complejo 1 mTOR. Estudios recientes indican que la transducción de la señal de aminoácidos al complejo 1 mTOR no requiere del complejo TSC1-TSC2, ya que se observó una fosforilación elevada de S6K1 en células carentes de TSC1 y TSC2. Al parecer, se requiere de Rheb-GTP para esta respuesta, pero este complejo es insuficiente para activar al complejo 1 mTOR en ausencia de aminoácidos. Estos resultados indican que la activación del complejo 1 mTOR por aminoácidos puede ocurrir a través de una vía de señalización paralela (Figura 2). En estudios previos, se ha descrito que la estimulación por aminoácidos del complejo 1 mTOR es sensible a wortmanina, a pesar de que los aminoácidos no inducen la activación de PKB. A través de estudios farmacológicos, bioquímicos y moleculares, se ha demostrado que los aminoácidos regulan la actividad de una PI3K clase III y que la activación de S6K1 y del complejo 1 mTOR por aminoácidos requiere de esta PI3K clase III (Dann y *col.*, 2007).

I.3.1.3. La proteína TOR.

La proteína cinasa blanco de rapamicina TOR se considera frecuentemente como un modulador maestro de la síntesis de proteínas (Martin y Blenis, 2002).

La rapamicina es un agente antifúngico purificado originalmente de *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina inhibe el crecimiento celular en varios tipos de células, y tiene como blanco a la proteína TOR aunque no la inhibe directamente sino a través de la formación de un complejo con la proteína FKBP12 (Sabers y col., 1995; Loewith y col. 2002; Corradetti y Guan, 2006; Averous y Proud, 2006).

TOR es una proteína de ~280 kDa en eucariontes, conservada evolutivamente (40% al 60% de identidad en su secuencia primaria) y pertenece a la familia de las cinasas dependientes de fosfoinosítidos (PIKKS) (Hay y Sonenberg, 2004; Corradetti y Guan, 2006; Wullschleger y col., 2006). Las PIKKS son proteínas cinasas atípicas exclusivas de los eucariontes, que median las respuestas celulares a varios tipos de estrés y a la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento (Templeton y Moorhead, 2005).

Cuando las condiciones de crecimiento son favorables TOR se encuentra activo y se ha observado que las células de levadura mantienen una tasa elevada de biogénesis de ribosomas, inicio de la traducción e importación de nutrientes (Wullschleger y col., 2006). En mamíferos, TOR es una cinasa que integra señales de disponibilidad de nutrientes, de energía y de factores de crecimiento que regulan el crecimiento celular (Kozma y Thomas, 2002; Fingar y Blenis, 2004; Hay y Sonenberg, 2004; Wullschleger y col., 2006; Proud, 2007b). mTOR es una cinasa de serina/treonina que controla muchos aspectos de la fisiología celular, entre los que se encuentran la transcripción, la traducción, el tamaño celular, la organización del citoesqueleto y la autofagia (Corradetti y Guan, 2006). En las células de mamíferos, la actividad y función de mTOR es controlada por varios factores, que incluyen niveles de aminoácidos, factores de crecimiento, disponibilidad de ATP, hipoxia y polifosfatos;

asimismo, se ha reportado que el ácido fosfatídico actúa como un intermediario de la vía de señalización de insulina, que interactúa directamente con mTOR en el mismo dominio en el que interactúa la rapamicina (Fang y *col.*, 2001; Martin y Hall, 2005).

Como se mencionó en el apartado anterior, mTOR controla la maquinaria de traducción por medio de la activación de S6K y de la inhibición de la proteína de unión del factor eucariótico de inicio de la traducción 4E (Martin y Blenis, 2002; Petroulakis y *col.*, 2006).

La proteína mTOR posee multidominios que participan en la formación de complejos con otras proteínas. En células de mamíferos, TOR es parte de dos complejos multiproteicos. Algunas de estas proteínas regulan la actividad de mTOR, como Raptor (proteína regulatoria asociada a mTOR) o Rictor (proteína insensible a rapamicina asociada a mTOR), la cual como indica su nombre forma un complejo con mTOR insensible a la rapamicina (Hara y *col.*, 2002; Jacinto y *col.*, 2004; Yang y *col.*, 2006). Como se indicó en el apartado anterior, ambos complejos están relacionados con la señalización de mTOR. Las interacciones de Raptor y Rictor con mTOR parecen ser mutuamente excluyentes. El complejo en el que participa Raptor se denomina mTORC1 (complejo 1 mTOR); el cual consiste principalmente de tres proteínas: mTOR, mLST8 (también conocida como GβL) y Raptor. Este complejo es el principal regulador de la biogénesis de ribosomas y de la síntesis de proteínas, es sensible a la rapamicina, modula el inicio de la traducción y reprime la transcripción de genes específicos que son inducidos por la carencia de nutrientes tales como aminoácidos (Peng y *col.*, 2002; Meijer y Codogno, 2004). Esto tiene sentido fisiológico, ya que mTORC1 activa la síntesis de proteínas que requieren aminoácidos como precursores (Proud, 2007b). El complejo en el que participa Rictor se denomina mTORC2 (complejo 2 mTOR), e incluye a mTOR, mLST8 y Rictor; este complejo es insensible a la rapamicina y participa en la reorganización de la actina del citoesqueleto. Como se mencionó anteriormente, los nutrientes regulan la señalización por medio de mTORC1, por lo que la carencia de nutrientes,

especialmente de aminoácidos y en particular de leucina, da como resultado una rápida defosforilación de los efectores de mTORC1, S6K1 y de 4E-BP1 (Hay y Sonenberg, 2004). Las células responden al estrés ambiental, como la hipoxia o niveles bajos de energía, disminuyendo procesos demandantes de energía y deteniendo el crecimiento. Se ha demostrado que TOR tiene un papel muy importante en la respuesta al estrés. Bajo hipoxia, la señalización de TOR es inhibida y por lo tanto la síntesis de proteínas es disminuida (Loewith y *col.* 2002; Averous y Proud, 2006). De esta forma, el crecimiento celular se encuentra fuertemente acoplado a la disponibilidad de nutrientes, mientras que la inhibición del crecimiento celular inicia procesos catabólicos, incluyendo la autofagia (Inoki y *col.*, 2005).

I.3.1.4. Activación de S6K por fosforilación.

La proteína S6K pertenece a la familia de proteínas cinasas AGC (de proteína cinasa A [PKA], proteína cinasa G [PKG] y proteína cinasa C [PKC]). La proteína cinasa dependiente de fosfoinositido-1 (PDK1) es el activador predominante de las cinasas AGC, y entre ellas fosforila a la S6K. (Mora y *col.*, 2004). La fosforilación de S6K contribuye a incrementar su actividad de protein cinasa (Thomas, 2002).

Existen dos formas de S6K: S6K1 y S6K2 (Shima y *col.*, 1998; Gout y *col.*, 1998), ambas proteínas son homólogas entre sí en varios dominios. La principal diferencia en su estructura se encuentra en los extremos amino y carboxilo terminales, aunque la diferencia más notable es su localización subcelular. Un procesamiento alternativo da como resultado dos isoformas para S6K1 (p70S6K1 y p85S6K1) y otras dos para S6K2 (p60S6K2 y p54S6K2). p70S6K1 es citosólica, mientras que p85S6K1 es nuclear, debido a su señal de localización nuclear NLS en la región N-terminal (Reinhard y *col.*, 1994). Las isoformas de S6K2 son predominantemente nucleares, debido a la presencia de una secuencia de localización nuclear NLS en la región carboxilo terminal de estas proteínas (Koh y *col.*, 1999). La diferencia en la localización celular de estas isoformas hace pensar que existen mecanismos de

regulación potencialmente distintos y/o diferentes sustratos para cada una de las isoformas (Park y *col.*, 2002).

La estructura de los dominios de S6K1 pueden dividirse en cuatro regiones, como se observa en la figura 3: un extremo NH₂-terminal, seguido por el dominio catalítico, la región de unión y un extremo COOH- básico, que contiene un dominio autoinhibitorio con un pseudosustrato (Dennis y *col.*, 1998).

En el extremo amino terminal de las S6K existe un motivo TOS (motivo de señalización de TOR) que interactúa con Raptor, la pareja de mTOR, para facilitar la fosforilación de S6K por mTORC1 (Schalm y Blenis, 2002). Cinco residuos de aminoácidos (Phe-Asp-Ile-Asp-Ile), localizados en el extremo amino terminal de S6K, forman el motivo TOS. La supresión o mutación del motivo TOS bloquea significativamente la activación de S6K inducida por insulina. Igualmente, la eliminación del extremo amino terminal de S6K convierte a esta enzima en insensible al tratamiento con insulina, lo que sugiere que el motivo TOS es crítico para la activación de S6K mediada por mTOR (Schalm y Blenis, 2002; Inoki y *col.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, S6K1 es activada por varias rutas en las que participan PI3K, Ras/MAPK, PDK1 y mTOR, que convergen en la fosforilación de varios residuos de Ser/Tre en S6K (Martin y Blenis, 2002; Hay y Sonenberg, 2004). Se han identificado ocho sitios susceptibles de ser fosforilados (Tre²²⁹, Ser³⁷¹, Tre³⁸⁹, Ser⁴⁰⁴, Ser⁴¹¹, Ser⁴¹⁸, Tre⁴²¹ y Ser⁴²⁴) en la proteína p70S6K endógena, los cuales se representan en la figura 3 (Dennis y *col.*, 1998, Averous y Proud, 2006). Se ha reportado que los residuos Ser⁴¹¹, Ser⁴¹⁸, Tre⁴²¹ y Ser⁴²⁴, residen dentro del dominio autoinhibitorio (denominado sitio S/TP), ubicado en el extremo carboxilo terminal de la cinasa (Price y *col.*, 1991). El sitio de fosforilación Tre²²⁹, localizado en el asa de activación, es un elemento de regulación común encontrado en varias cinasas (Hanks y Hunter, 1995).

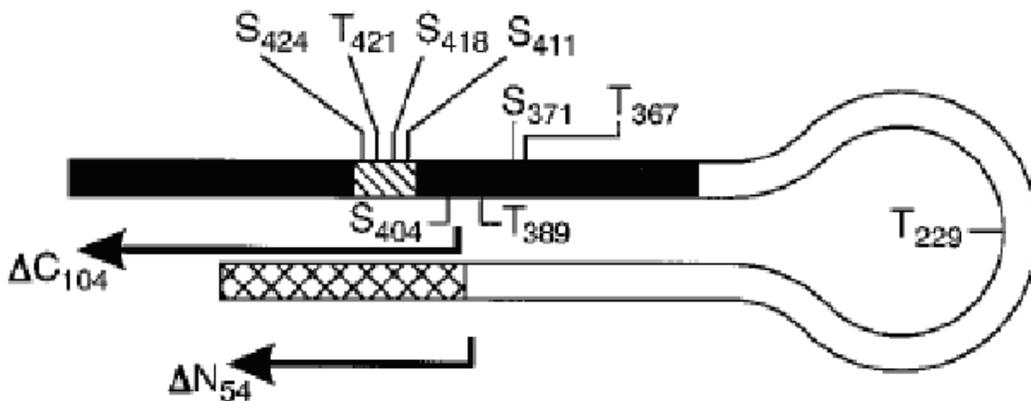


Figura 3. Diagrama esquemático de los dominios y sitios de fosforilación de la proteína p70S6K. El extremo NH₂-terminal ácido se representa por el segmento cuadrículado, seguido por el dominio catalítico y la región de unión representado por el segmento blanco y el extremo COOH- básico representado en negro que contiene un dominio autoinhibitorio con un pseudosustrato, representado con líneas diagonales (Dennis y *col.*, 1998).

Entre los principales sitios de S6K fosforilados por TOR se encuentran Tre³⁸⁹ y Ser³⁷¹, ya que se ha observado que su fosforilación se inhibe por rapamicina y son esenciales para la activación de S6K (Han y *col.*, 1995). Se ha sugerido que S6K1 normalmente aparece en una conformación inactiva, en la que el extremo amino terminal ácido interactúa con la región carboxilo terminal básica, estabilizando la interacción del dominio de pseudosustrato con el sitio catalítico. Se ha propuesto un modelo en el que la fosforilación de los cuatro sitios del extremo C-terminal inicia la activación de S6K1, relajando la conformación de la cinasa y permitiendo la fosforilación del residuo Tre³⁸⁹, lo que se propone crea un sitio para la entrada de PDK1 y trae como resultado la fosforilación final de Tre²²⁹ por PDK1. No obstante, algunos autores consideran este modelo muy simplista (Saitoh y *col.*, 2002).

I.3.1.5 Procesos celulares regulados por la fosforilación y activación de S6K.

La activación de S6K se requiere para completar la fase G1 y la progresión a la fase S del ciclo celular, y tiene un papel importante en la regulación del tamaño celular en mamíferos y en la mosca de la fruta (Peterson y Schreiber, 1998). Además de tener un papel muy importante en la regulación del crecimiento, S6K parece ser una proteína multifuncional relacionada con otros procesos celulares tales como los procesos anti-apoptóticos y el procesamiento del ARN (Ruvinsky y *col.*, 2005). Recientemente, se demostró que la delección de la proteína S6K1 en ratones, produce un incremento en el tiempo de vida y resistencia a patologías relacionadas con la edad. Además, se encontró que la delección de S6K1 produjo patrones de expresión genética similares a los que se observan con dietas con restricción calórica o con activación farmacológica de la cinasa AMPK, un componente de la respuesta metabólica a restricción calórica. Estos resultados colocan a S6K1 como un mediador entre la longevidad y la disponibilidad de nutrientes y permiten entender los mecanismos por los que dietas con restricción calórica protegen contra enfermedades asociadas al envejecimiento y aumentan el tiempo de vida (Selman y *col.*, 2009).

I.3.1.6. Fosforilación de la proteína ribosomal S6.

Como se mencionó anteriormente, la proteína S6K1 activada fosforila a PRS6, una de las 33 proteínas de la subunidad 40S, la cual se ensambla en la región de unión del ARNm al ribosoma (Nygård y Nilsson, 1990). La PRS6 reside en el nucleoplasma en forma libre, en el nucleolo, y en partículas prerribosomales, en donde es fosforilada durante la biogénesis de ribosomas, en respuesta a mitógenos. También se encuentra fosforilada como parte de los ribosomas en el citoplasma (Franco y Rosenfeld, 1990; Pende y *col.*, 2004).

La PRS6 presenta varios residuos de serina fosforilables en el extremo carboxilo terminal (Ser²³⁵, Ser²³⁶, Ser²⁴⁰, Ser²⁴⁴, y Ser²⁴⁷), aminoácidos que se encuentran conservados evolutivamente (Krieg y col., 1988; Fumagalli y Thomas, 2000; Ruvinsky y Meyuhas, 2006). Se ha propuesto que la fosforilación de la PRS6 progresa de forma ordenada y que el primer sitio de fosforilación es la Ser²³⁶ seguido de la Ser²³⁵, Ser²⁴⁰, Ser²⁴⁴ y finalmente la Ser²⁴⁷. El estado de fosforilación de la PRS6 en mamíferos es modulado por las acciones opuestas de diversas proteínas cinasas y fosfatasas, que son activadas en respuesta a estímulos externos, señales intracelulares y del desarrollo (Fumagalli y Thomas, 2000; Kozma y Thomas, 2002; Pende y col., 2004).

La fosforilación de PRS6 es uno de los primeros eventos detectados que siguen a la estimulación con mitógenos y se correlaciona con la iniciación de la síntesis de proteínas, por lo que se ha sugerido que los ribosomas con mayor proporción de fosforilación en la proteína PRS6 pueden unir preferencialmente algunos ARNm, movilizándolos hacia los polisomas e introduciendo una traducción selectiva (Hershey, 1989; Meyuhas y Hornstein, 2000).

En animales se ha reportado que la insulina, los factores semejantes a insulina IGF-I e IGF-II, la interleucina y algunos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), así como varios compuestos con acción mitogénica, pueden ser efectores de la vía que conduce a la fosforilación de la PRS6 del ribosoma (Thomas y col., 1982; Stewart y Thomas, 1994).

La proteína S6K es bien conocida como la cinasa de PRS6. En *Drosophila* la fosforilación de PRS6 se lleva a cabo por una cinasa denominada dS6K, mientras que en animales como se mencionó previamente, la fosforilación de PRS6 se realiza por cinasas relacionadas con la familia de cinasas de treonina/serina, denominadas

S6K1 y S6K2, así como por la cinasa de PRS6, denominada RSK o p90 (Fumagalli y Thomas, 2000; Kozma y Thomas, 2002).

Se ha demostrado que mientras la proteína S6K1 fosforila a PRS6 en todos los sitios fosforilables, la cinasa RSK fosforila a PRS6 exclusivamente en las posiciones Ser²³⁵ y Ser²³⁶, tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando una vía independiente de mTOR. Esto sugiere que los diferentes sitios de fosforilación de PRS6 pueden llevar a cabo diferentes funciones (Roux y col., 2007). Mutaciones de PRS6 en los sitios Ser^{235/236} revelaron que la fosforilación de estos sitios promueve su reclutamiento en el capuchón 7-metilguanosina, sugiriendo que la señalización por la vía de Ras/ERK regula el ensamblaje del complejo de preiniciación de la traducción (Roux y col., 2007).

Algunos autores sugieren que la fosforilación de PRS6 aumenta la traducción de los ARNm denominados 5'TOP, que codifican para componentes de la maquinaria traduccional (Pende y col., 2004; Ruvinsky y col., 2005). Previamente, se había propuesto que estos mensajes están sujetos a una represión traduccional selectiva en un arresto en el crecimiento y que su comportamiento traduccional correlaciona con la actividad de S6K1. Tang y colaboradores (2001) demostraron que la traducción de los ARNm 5'TOP es rápidamente reprimida al suprimir los aminoácidos y este control nutricional depende únicamente de la integridad del motivo 5'TOP, siendo independiente de S6K y de la fosforilación de PRS6. En células mutantes S6K1^{-/-}/ S6K2^{-/-}, que carecen de ambas cinasas, se disminuyó la viabilidad de los ratones pero no pareció afectarse la respuesta proliferativa de este tipo de células, ni la traducción eficiente de los ARNm 5'TOP, por lo que se concluyó que la traducción de este tipo de mensajes no depende de la actividad de S6K. Se encontró en forma inesperada que en las células mutantes S6K1^{-/-} y S6K2^{-/-}, la fosforilación de PRS6 persistió en las Ser²³⁵ y Ser²³⁶, los primeros dos sitios fosforilados en respuesta a mitógenos, por lo que se sugirió un mecanismo alternativo para la fosforilación de

PRS6 en ausencia de S6K1 y S6K2, a través de una ruta activada por MAPKs (Pende y col., 2004).

La inhibición en la vía de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) por medios químicos, como la wortmanina, o la manipulación genética bloquearon rápida y completamente la activación traduccional de los ARNm 5'TOP. Por ello se concluyó que la regulación traduccional de los ARNm 5'TOP, al menos por aminoácidos, es completamente dependiente de PI3K, parcialmente sensible a la rapamicina y no requiere de la actividad de S6K1 o de la fosforilación de PRS6 (Jefferies y col., 1994; Jefferies y Thomas, 1996; Meyuhas y Hornstein, 2000; Tang y col. 2001; Barth-Baus y col., 2002). Por otra parte, estudios en ratones en los que todos los sitios de fosforilación de PRS6 fueron cambiados a alaninas, indicaron que la fosforilación de PRS6 no era necesaria para el control traduccional de los ARNm 5'TOP (Ruvinsky, y col., 2005).

I.4. VÍA DE TRANSDUCCIÓN PI3K-TOR EN PLANTAS.

Las plantas presentan un crecimiento plástico que depende de la información del ambiente y de señales internas. Se conoce relativamente poco acerca de las vías de transducción que regulan el crecimiento y el desarrollo. Grupos de células totipotenciales, llamadas meristemos, presentes durante toda la vida de la planta, dan lugar a todos los órganos post-embrionarios (radículas, hojas, pétalos y frutos, entre otros). Dichos meristemos permiten a las plantas cambiar su crecimiento y desarrollo en respuesta tanto a señales del ambiente, como a señales hormonales y nutricionales (Anderson y col., 2005; Deprost y col., 2007).

Deprost y colaboradores (2007) han reportado que el crecimiento de *Arabidopsis* se correlaciona positivamente con el nivel de expresión de la cinasa TOR. La disminución o el aumento de la expresión del gen AtTOR da como resultado un decremento o un aumento, dependiente de la dosis, del tamaño de las células y órganos, así como de la producción de semillas y de la resistencia al estrés

osmótico. AtTOR es una proteína de 2481 aminoácidos, comparada con los 2549 aminoácidos de la proteína humana. AtTOR es 39% idéntica a su contraparte en humanos, haciéndola el miembro más conservado de la familia de las PIKK entre humanos y plantas. En arroz también se ha identificado un gen que codifica para TOR (Templeton y Moorhead, 2005).

Se ha demostrado que la proteína reguladora de TOR, RAPTOR1 de *Arabidopsis*, interactúa con las repeticiones HEAT de TOR. RAPTOR1 también interactúa con S6K1 de *Arabidopsis* (uno de los sustratos de TOR *in vivo*); además RAPTOR1 regula la actividad de la cinasa S6K en respuesta a estrés osmótico. El dominio catalítico de S6K1 puede ser fosforilado por PDK1 de *Arabidopsis*, indicando que la proteína PDK1 está implicada en la regulación de S6K. Las observaciones anteriores permitieron demostrar la existencia de una vía funcional de TOR en plantas. Sin embargo, se observó que las plántulas de *Arabidopsis* no respondieron a rapamicina en los niveles que inhibe TOR en células animales. Algunos autores sugieren que esto puede deberse a la falta de capacidad de unión de FKBP12 con la rapamicina (Mahfouz y col., 2006), o bien a que el complejo FKBP12 con rapamicina no interactúa con TOR; en consecuencia, se considera que algunas plantas son insensibles a rapamicina (Templeton y Moorhead, 2005).

Los datos anteriores sugieren que los blancos “río abajo” de PDK1 pueden ser similares en las células de levadura, animales y plantas. En comparación con la PDK1 de levadura y de animales, la PDK1 de *Arabidopsis* carece del dominio PH y la PDK1 de arroz carece de dos residuos de aminoácidos que se requieren para una alta afinidad en la unión con PI(3,4,5)P₃. Además, se demostró que la PDK1 de *Arabidopsis* tiene un amplio espectro de unión a lípidos, sugiriendo que los lípidos activadores de las PDK1 en plantas pueden diferir de los que actúan en animales (Anthony y col., 2004).

Crespo y colaboradores (2005) encontraron que la actividad de TOR en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* se inhibe por rapamicina, con lo que se

demonstró que la proteína FKBP12 de organismos fotosintéticos también es una rapamicina. Por otro lado, en ejes embrionarios de maíz García Flores y colaboradores (2001) encontraron que la rapamicina inhibe la fosforilación de PRS6 lo que indica que también hay plantas que son sensibles a rapamicina.

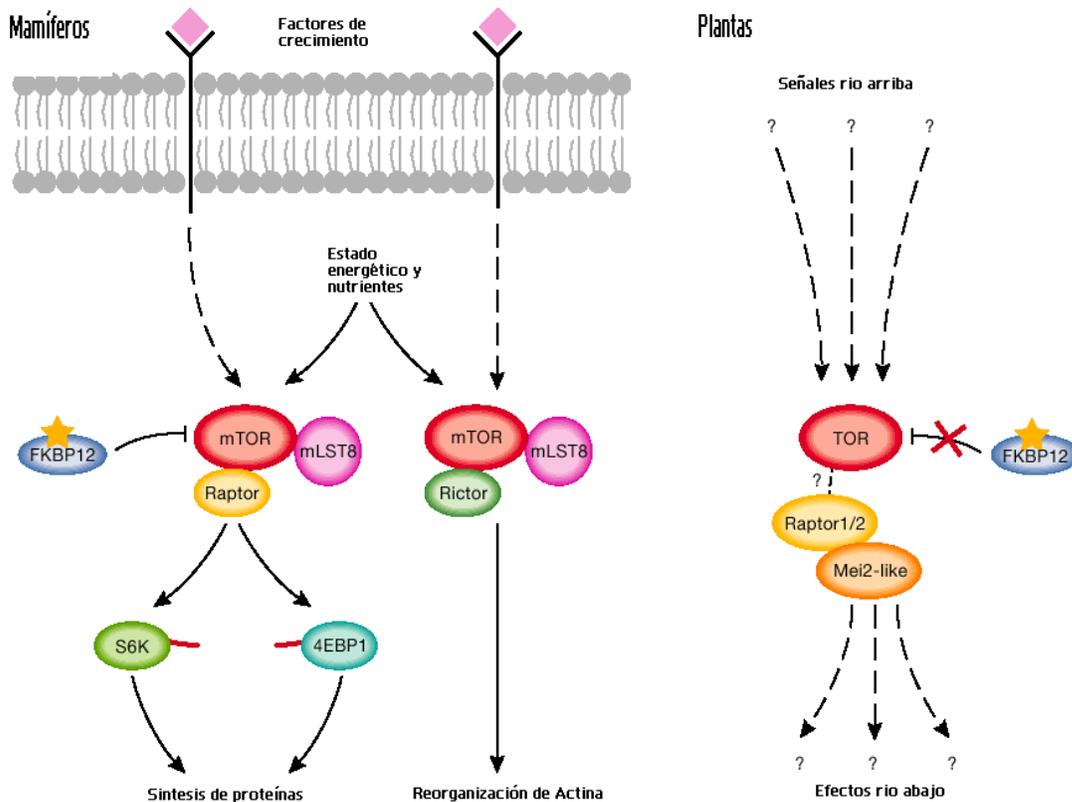


Figura 4. Modelo de la señalización de la proteína TOR en animales y plantas, la proteína FKBP12 se señala con una estrella amarilla, el motivo TOS se ilustra con una línea roja en las proteínas S6K y 4EBP1 (Templeton y Moorhead, 2005).

En la figura 4 se comparan los modelos de señalización de la cinasa TOR de animales con el de plantas. En células de mamíferos se muestra que la proteína mTOR recibe señales de nutrientes, factores de crecimiento y del estado energético. Como se mencionó, la proteína TOR de mamíferos así como la de levaduras forma parte de dos complejos, uno sensible y otro insensible a rapamicina, y cada uno tiene algunas proteínas en común y otras diferentes (Figura 3 y Figura 4). La sensibilidad a

la rapamicina del complejo mTOR-Raptor es conferida por la unión de rapamicina a la proteína FKBP12, S6K y 4EBP1 se acoplan con el complejo de mTOR a través del motivo TOS. En plantas, los eventos de señalización “río arriba” y “río abajo” de TOR todavía no se han identificado completamente. Aún cuando la rapamicina se une a la FKBP12 de plantas, en algunos casos este complejo al parecer falla al interactuar con TOR, lo que originaría la insensibilidad a la rapamicina (Templeton y Moorhead, 2005).

Aún cuando la información de los intermediarios de la vía de transducción de TOR en plantas es escasa, se han realizado investigaciones recientes en las que se han caracterizado proteínas que pertenecen a esta ruta de transducción de señales. En este sentido, se ha caracterizado la proteína TOR en maíz denominada ZmTOR (Agredano-Moreno y col., 2007). Por otra parte, el genoma de *Arabidopsis* contiene dos genes que codifican proteínas que comparten una gran homología con las proteínas S6K1 y S6K2 de mamíferos (Volarevic y Thomas, 2001). Turck y colaboradores (2004), por su parte, encontraron que la adición de medio fresco a células de cultivos en suspensión de *Arabidopsis* en fase estacionaria, inducen el incremento de la fosforilación de PRS6 y la activación de su correspondiente cinasa AtS6K. El análisis de la respuesta de activación reveló que los constituyentes del medio fresco que activaron a AtS6K fueron las fitohormonas ácido 1-naftalen acético (α -ANA) y cinetina. Por otra parte, Reyes de la Cruz y colaboradores (2004) caracterizaron en maíz una proteína ZmS6K de 62 kDa, que es estructural y funcionalmente similar a la p70S6K de mamíferos. En maíz, la PRS6 es codificada por al menos dos genes altamente conservados, con abundantes transcritos en tejidos y órganos con altas tasas de división celular. Estos genes fueron muy similares en su región 5'-UTR y en sus regiones codificantes (85% y 94% de identidad, respectivamente) y presentaron una divergencia del 41% en sus regiones 3'-UTR. Ambos genes codifican para proteínas de aproximadamente 30 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 11.4, con una secuencia de aminoácidos y una estructura secundaria similar a la de la PRS6 de otros eucariontes. La secuencia deducida de

aminoácidos de la proteína ZmPRS6 parece estar altamente conservada entre los eucariontes (54.2% entre maíz y levadura; 87.3% entre maíz y *Arabidopsis*). En la región carboxilo terminal se identificaron varios sitios potenciales de ser fosforilados (KRRS₂₃₈KLS₂₄₁AAAKAS₂₄₇AAT₂₅₀S₂₅₁A-COOH). También se identificaron distintas formas fosforiladas de PRS6 en radículas de plántulas de maíz desarrolladas bajo distintas condiciones de estrés (temperatura, oxígeno, etc.), observándose diferencias en la migración en isoelectroenfoque, que corresponderían a las variaciones en la fosforilación de los residuos serina y treonina (Williams y col., 2003).

En ejes embrionarios de maíz en germinación se demostró recientemente que la señalización de TOR-S6K es estimulada por insulina de mamífero o por el péptido endógeno de maíz semejante a insulina denominado ZmIGF. Por ello se concluyó que la vía de transducción de señales PI3K TOR es funcional en la semillas de maíz en germinación (Dinkova y col., 2007).

I.5. EFECTOS DE LAS AUXINAS Y LA INSULINA EN PLANTAS.

I.5.1. Auxinas.

El crecimiento y desarrollo de las plantas se encuentra regulado por señales endógenas y del ambiente que determinan la forma de la misma. En estos procesos son fundamentales varios reguladores del crecimiento, como las fitohormonas, entre las que se incluyen las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, brasinosteroides y ácido jasmónico, entre otros (Buchanan y col., 2000).

Las auxinas son hormonas vegetales que regulan múltiples procesos. En la planta completa están involucradas en el mantenimiento de la dominancia apical, en la regulación de algunos tropismos, en la formación y desarrollo de radículas laterales y adventicias y en el desarrollo de las hojas y tejidos vasculares, entre otros. En las

células, las auxinas se han implicado en el control del alargamiento, división y diferenciación celular (Abel y Theologis, 1996; Guilfoyle y *col.*, 1998; Walker y Estelle 1998).

Las auxinas pueden estimular o inhibir el crecimiento celular, dependiendo de su concentración, localización y de su interacción con otras señales hormonales en la planta. En los tallos y coleoptilos las auxinas inducen el alargamiento en concentraciones bajas, del orden de μM (Leyser, 1998). Asimismo, la aplicación de auxinas en concentración de 10 nM produce una disminución en el crecimiento de la raíz de maíz (Meuwly y Pilet, 1991), mientras que induce la formación de radículas laterales en dosis de 10 a 100 nM (Woodward y Bartel, 2005).

La auxina natural que se presenta más comúnmente en las plantas, y la más estudiada, es el ácido indol acético (AIA), una molécula derivada del triptófano. Otros compuestos con actividad de auxinas son el ácido 3,6-dicloro-o-anísico (DICAMBA) y el α -ANA, considerados como auxinas sintéticas (Moore, 1989).

El transporte polar de las auxinas es esencial para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas. A nivel celular, el transporte direccional de las auxinas está controlado por transportadores específicos de plantas de la familia de las proteínas PIN, que establecen la dirección del flujo y contribuyen a la acumulación localizada de auxinas, esenciales para la formación de órganos y la polaridad del crecimiento vegetal (Blakeslee y *col.*, 2005).

Se han aislado proteínas que se unen a las auxinas y que pueden ser receptores de estas hormonas. La proteína ABP1, una proteína soluble de 22 kDa que une específicamente a las auxinas, es la mejor caracterizada. Se ha propuesto que las auxinas inducen el alargamiento celular, posiblemente a través de la actividad de la proteína ABP1 (Macdonald, 1997). Recientemente, se sugirió que la proteína TIR1 también tiene la función de receptor de estas hormonas (Quint y Gray, 2006).

Las auxinas tienen un papel importante en la regulación de la expresión génica. (Gantt y Key, 1985; Guilfoyle y col., 1998). Estudios moleculares recientes demuestran que se presenta un incremento rápido y específico de la expresión de varios genes en respuesta a la aplicación exógena de auxinas. Se han caracterizado tres familias de genes de respuesta temprana a las auxinas (*SAURs*, *Gh3s* y *Aux/IAAs*) y genes que codifican para proteínas ribosomales, los que son inducidos minutos después de la aplicación de estas hormonas (Gantt y Key, 1985; Abel y Theologis, 1996; Hagen y Guilfoyle., 2002).

Las auxinas alteran el patrón de proteínas sintetizadas durante la germinación de ejes embrionarios de maíz (Pérez y col., 1987) y este cambio está acompañado por un aumento en la fosforilación de proteínas ribosomales (Pérez y col., 1990), entre las cuales se encuentra la proteína S6 de la subunidad 40S (Sánchez de Jiménez y col., 1997; Beltrán-Peña y col., 2002). En ejes embrionarios de maíz estimulados con la auxina natural AIA, se observó un aumento en la fosforilación de la PRS6 de la subunidad 40S, así como un incremento en el reclutamiento a los polisomas de ARNm 5'TOP que codifican para el factor de inicio de la traducción eIF-iso4E y para la proteína ribosomal S6 (Dinkova y col., 2000; Beltran-Peña y col., 2002).

Como se mencionó previamente, en cultivo de células de *Arabidopsis* se encontró que la adición de medio fresco a células en fase estacionaria inducía un aumento en la fosforilación de PRS6 y en la activación de AtS6K, la cual es regulada por fitohormonas, en particular por la auxina α -ANA y la citocinina cinetina (Turck y col., 2004).

En plantas, se ha reportado que las auxinas aumentan los niveles de Ca^{2+} citoplásmico proveniente de los reservorios internos y se ha propuesto que este ión puede actuar como segundo mensajero (Macdonald, 1997).

I.5.2. Insulina.

La insulina es una hormona liberada por las células beta pancreáticas en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre. La insulina dispara la toma de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos en el tejido adiposo, en músculo e hígado y promueve el almacenamiento de estos nutrientes en forma de glucógeno, lípidos y proteínas respectivamente. La toma de glucosa es estimulada por esta hormona mediante la inducción de la translocación del transportador de glucosa a la membrana plasmática. La insulina controla directamente las actividades de un grupo de enzimas del metabolismo por fosforilación y desfosforilación y también regula la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la gluconeogénesis (Hooper, 2009). La insulina estimula la toma de aminoácidos a las células, inhibe la degradación de proteínas y promueve la síntesis de proteínas (Saltiel y Kahn, 2001). Como se mencionó previamente la inducción de la síntesis de proteínas por insulina ocurre a través de la vía PI3K TOR.

Los IGFs tienen algunas funciones semejantes a las de insulina, entre ellas la de regular la síntesis de proteínas por la vía PI3K TOR. Existen en todos los eucariontes, desde levaduras hasta mamíferos en los que controlan el crecimiento (Thomas y *col.*, 1982; Thomas, 2002).

En semillas de maíz, la insulina acelera la germinación y el crecimiento de las plántulas. Este efecto está acompañado de la estimulación de la síntesis de proteínas, en particular de proteínas ribosomales específicas (Rincón-Guzmán y *col.*, 1998; Sánchez de Jiménez y *col.*, 1999; Sánchez de Jiménez, 2000; García-Flores y *col.*, 2001). Se ha observado que la insulina promueve la movilización a polisomas de mensajes relacionados con la síntesis de proteínas como el de PRS6 y del factor de iniciación de la traducción eIF4E, probablemente por la misma vía utilizada en animales, que involucra a la cinasa TOR y a la proteína ZmS6K, un homólogo de la

proteína p70^{S6K}, ya que la aplicación de rapamicina inhibe ambos efectos (Dinkova y col., 2000; Reyes de la Cruz y col., 2004; Dinkova y col., 2007).

Asimismo, se ha aislado de ejes embrionarios de maíz en germinación, un factor peptídico endógeno semejante a insulina denominado ZmIGF, con estructura secundaria semejante a la de la insulina (Rodríguez y col., comunicación personal). El ZmIGF actúa de manera similar a la insulina estimulando la germinación y el crecimiento e induciendo la fosforilación de PRS6 y la síntesis específica de proteínas ribosomales (García Flores y col., 2001).

Recientemente se ha demostrado que tanto la insulina como el ZmIGF incrementan la síntesis de DNA y el índice mitótico en cultivos de maíz *in vitro*. Asimismo, se observó que estos efectores inducen un aumento significativo en la biomasa y en la síntesis de proteínas ribosomales. Por otra parte, se encontró que la síntesis de ciclinas tipo D y de PCNA se incrementa, principalmente por la movilización de los mensajes de estas proteínas a los polisomas. Estos efectos se revierten en presencia de rapamicina, indicando la participación de TOR. Estos resultados apoyan la participación de la vía PI3K-TOR en la regulación coordinada del crecimiento y la división celular en maíz (Sotelo y col., en prensa).

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo, indican que tanto las auxinas como la insulina promueven el crecimiento de coleótilos de maíz, inducen la síntesis y fosforilación de proteínas y ambas vías de transducción tienen elementos en común, ya que ambos efectores fosforilan a PRS6. Por ello se había sugerido que ambas vías de transducción podrían entrecruzarse, aunque los patrones de formas fosforiladas de PRS6 obtenidos con AIA y con insulina en coleótilos de maíz son claramente distintos, probablemente por la activación diferencial de S6K. En el caso de la insulina, se encontró que la fosforilación de PRS6 es mediada por la activación de S6K por la cinasa TOR, ya que esta respuesta fue inhibida por rapamicina. Asimismo, se encontró que PA parece ser un intermediario de la vía de transducción

de insulina. Por otra parte, la fosforilación de PRS6 inducida por auxinas fue insensible a rapamicina, lo que sugiere que esta vía es independiente de TOR (Buentello y *col.*, comunicación personal). Antecedentes de la literatura sugieren que las auxinas incrementan en forma transitoria la concentración citoplásmica de Ca^{2+} (Felle, 1988; Arif y Newman, 1993), lo que podría dar origen a la activación de una cinasa dependiente de Ca^{2+} que fosforila a S6K, posiblemente PDK1, o a la activación directamente de S6K. Estos resultados sugieren que en coleoptilos las vías de transducción de ambos efectores (insulina y auxinas) no confluyen funcionalmente y que al parecer estos efectores promueven el crecimiento de los coleoptilos de maíz por mecanismos distintos (Buentello y *col.*, comunicación personal).

II. JUSTIFICACIÓN.

Las auxinas son hormonas esenciales en plantas que regulan diversos procesos del crecimiento y desarrollo. Recientemente se ha reportado que la insulina y factores semejantes a la insulina (IGF) también inducen la germinación y el crecimiento en semillas de maíz. Los mecanismos de acción de las auxinas y de la insulina/ZmIGF no se conocen con precisión en maíz y tampoco se conocen las bases moleculares para la especificidad de las respuestas en el desarrollo y en distintas partes de las semillas.

Durante la germinación, las semillas pasan de un estado quiescente a un estado metabólicamente activo. Entre los procesos metabólicos que se reinician durante la germinación se encuentra la síntesis de proteínas, que en etapas tempranas de imbibición está basada en la traducción de ARNm almacenados presentes en los ejes embrionarios y en etapas posteriores requiere de la transcripción de nuevos ARNm y su posterior traducción. Estudios previos indican que tanto las auxinas como la insulina/ZmIGF inducen la fosforilación de PRS6 y dicha fosforilación, al parecer, forma parte de una vía de regulación traduccional de la síntesis de proteínas. Por ello resulta interesante profundizar en el estudio del mecanismo de acción de las auxinas y de la insulina/ZmIGF y los efectos de estas hormonas en la fosforilación de la cinasa S6K y de la PRS6 en radículas de semillas de maíz en germinación.

El conocimiento de los mecanismos de acción de auxinas e insulina/ZmIGF en la germinación y el crecimiento vegetal podrían tener importantes aplicaciones en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas en la agricultura.

Debido a la disponibilidad restringida de ZmIGF, en el presente estudio se usó insulina como efector sustituto del ZmIGF.

III. HIPÓTESIS.

Las vías de transducción de señales inducidas por auxinas e insulina/ZmIGF convergen en la fosforilación de PRS6 en radículas de ejes embrionarios de maíz en germinación, produciendo distintas formas fosforiladas debido a la activación diferencial de la cinasa S6K, lo que explicaría las diferentes respuestas encontradas previamente en coleoptilos de maíz tratados con auxinas o insulina. La activación diferencial de esta cinasa podría ser uno de los puntos de regulación en la respuesta al estímulo de crecimiento inducido por cada efector.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Analizar el efecto de auxinas e insulina en la fosforilación y activación de S6K y en la fosforilación de PRS6 en radículas de semillas de maíz durante la germinación.

IV.1 Objetivos particulares:

- Determinar el efecto de auxinas e insulina en el crecimiento de radículas de semillas maíz en germinación.
- Determinar y comparar los patrones de formas fosforiladas de S6K en respuesta a auxinas o insulina en radículas de semillas de maíz en germinación.
- Determinar la cinética *in vitro* de S6K aislada de radículas de semillas de maíz en germinación estimuladas con auxinas o insulina usando el sustrato artificial RSK.
- Determinar y comparar los patrones de formas fosforiladas de PRS6 en respuesta a auxinas o insulina en radículas de semillas de maíz en la germinación.

V. MATERIAL Y METODOS:

V.1. Material biológico.

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays L.* variedad Chalqueño). Estos fueron desinfestados con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% (v/v) durante 10 min. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua estéril. Los granos desinfestados se imbibieron en algodón humedecido con agua estéril, a 25°C durante 22 h, y se disectaron los ejes embrionarios completos. Los ejes embrionarios aislados de semillas imbibidas durante 22 h se sometieron a los tratamientos con los efectores (auxinas o insulina) en medio MS.

V.2. Curva de dosis respuesta con tratamientos continuos de auxinas a distintas concentraciones.

Para determinar la dosis de auxinas (AIA) que induce el crecimiento de la radícula, se realizó un primer experimento con tratamiento continuo de auxinas. Se formaron tres lotes de 50 ejes disectados de semillas por tratamiento, imbibidas durante 22 h. Los ejes embrionarios disectados se incubaron 2 horas más en medio MS sin AIA o en presencia de AIA en diferentes concentraciones (0.001, 0.01 y 10 μM). Se midió la longitud de las radículas de cada lote de ejes embrionarios inmediatamente después del tratamiento de dos horas con AIA (24 h totales de imbibición). Posteriormente, los ejes embrionarios se colocaron en cajas de Petri, sobre papel de filtro humedecido con medio MS o con medio MS en presencia continua de AIA en diferentes concentraciones (0.001, 0.01 y 10 μM), a 25°C y se midió la longitud de las radículas de los ejes embrionarios cada 24 h hasta las 96 h. En cada determinación se cambiaron las soluciones de medio MS con o sin auxinas para mantener constante la concentración de AIA.

V.3. Curva de dosis respuesta con pulsos de dos horas de distintas concentraciones de AIA.

Para determinar el efecto del tratamiento con pulsos de AIA a distintas concentraciones en el crecimiento de las radículas, se formaron tres lotes de 50 ejes disectados de semillas, imbibidas por 22 h, por tratamiento. Los ejes disectados se incubaron 2 horas más en medio MS sin AIA, o bien con medio MS en presencia de AIA en diferentes concentraciones (2, 10 y 15 μM). Se midió la longitud de las radículas de cada lote de ejes embrionarios inmediatamente después del tratamiento con AIA (24 h totales de imbibición). A continuación se lavaron los ejes embrionarios con agua, se colocaron en cajas de Petri sobre papel de filtro humedecido con medio MS a 25°C, y se midió la longitud de las radículas cada 24 h hasta las 96 h. En cada determinación se cambio el medio MS.

V.4. Efecto de la insulina en el crecimiento de la radícula.

Para determinar el efecto del tratamiento sobre el crecimiento de la radícula de un pulso de 2 h de insulina, se formaron tres lotes de 50 ejes embrionarios por tratamiento. Los ejes disectados se incubaron 2 horas más en medio MS (testigo) o en medio MS en presencia de insulina con una concentración de 200 $\mu\text{U/mL}$. Se midió la longitud de las radículas de cada lote de ejes embrionarios inmediatamente después del tratamiento con insulina (24 h totales de imbibición). A continuación, se lavaron los ejes embrionarios con agua, se colocaron en cajas de Petri sobre papel de filtro humedecido con medio MS a 25°C, y se midió la longitud de las radículas cada 24 h hasta las 96 h, en cada medición se cambió el medio MS.

V.5. Obtención del material biológico para el aislamiento de la enzima S6K y de la proteína PRS6.

En los experimentos en los que se analizaron las formas fosforiladas de S6K y de PRS6, la incubación con los efectores auxina o insulina se realizó en presencia de 100 μCi [^{32}P]-ortofosfato. Después de la aplicación de los tratamientos, los ejes embrionarios se lavaron tres veces con agua estéril y el eje embrionario se separó en radícula y parte aérea. El tejido de la radícula se congeló con N_2 líquido y se almacenó a -70°C hasta su uso.

V.6. Extracción de la proteína ZmS6K.

Se siguió la técnica descrita por Reyes de la Cruz (2004) con las siguientes modificaciones: las radículas de los ejes embrionarios tratados con los diferentes efectores se pulverizaron con nitrógeno líquido y se homogenizaron con 3 mL por gramo de tejido de buffer de extracción [HEPES 50 mM, pH 7.6, pirofosfato de sodio 50 mM, vanadato de sodio 1 mM, molibdato de sodio 1 mM, EDTA 4 mM, EGTA 20 mM, benzamidina 1 mM, fluoruro de sodio 20 mM, β -glicerofosfato 80 mM, manitol 200 mM, PMSF 0.2 mM, DTT 2 mM y PVPP 0.7% (p/v)]. El homogenado se centrifugó a $27,000 \times g$ durante 30 min a 4°C . Los sobrenadantes se consideraron como los extractos crudos para analizar las formas fosforiladas de ZmS6K. Las proteínas se cuantificaron con un ensayo comercial basado en el método de Bradford (Bio-RAD no. Catálogo 500-0006) (Bradford, 1976).

V.7. Separación de la proteína ZmS6K por cromatografía de afinidad.

Para la inmunoprecipitación de la enzima S6K de maíz se siguió el método descrito por Turck y *col.* (2004), con las siguientes modificaciones: 3 mg de proteínas citoplásmicas del extracto crudo se diluyeron en 500 μ L de buffer A (Tris HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet-P 40 0.05% p/v) más 2 mM de benzamidina y 1 μ M de PMSF. El extracto diluido se mezcló con 5 μ L de anticuerpo anti p70^{S6K} (Santa Cruz no. Catálogo sc-230) en una dilución de 1:200 y la mezcla se incubó toda la noche a 4°C, con agitación constante. A continuación, se le adicionaron 100 μ L de proteína A-sefarosa y se incubó a 4°C durante 4 h más. La mezcla se hizo pasar a través de una punta de micropipeta taponada con fibra de vidrio y la microcolumna se lavó cuatro veces con buffer B (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 1 mM, Nonidet-P40 0.05% p/v, Triton X-100 0.25% p/v) y tres veces con buffer A, 100 μ L en cada lavado. Finalmente, la ZmS6K se eluyó de la columna con 300 μ L de buffer de muestra (Tris 60 mM, pH 7.5, SDS 2% p/v, Glicerol 10% p/v). Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976).

V.8. Extracción de la proteína ribosomal S6.

Se siguió la técnica descrita por Reyes de la Cruz (2004) con las siguientes modificaciones: las radículas de los ejes embrionarios tratados con los diferentes efectores se pulverizaron con nitrógeno líquido y se homogeneizaron con 10 mL de buffer de extracción para PRS6 (Tris-ácido acético 50 mM, pH 8.2, cloruro de potasio 50 mM, acetato de magnesio 5 mM, sacarosa 250 mM, β -mercaptoetanol 5 mM) por gramo de tejido, se añadieron 0.150 g de PVPP en el momento de homogeneizar. El homogenado se centrifugó a 27,000 x g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se colocó sobre 2.5 mL de un colchón de sacarosa (sacarosa 0.5 M, cloruro de potasio 800 mM), se centrifugó a 100,000 x g durante 4 h a 4°C. La pastilla ribosomal se resuspendió en 500 μ L de buffer A3 (HEPES 200 mM, KOH 20 mM, acetato de magnesio 5 mM, acetato de potasio 125 mM, β -mercaptoetanol 6 mM).

Posteriormente, se adicionaron 50 μL de acetato de magnesio 1 M, y 1100 μL de ácido acético glacial, se agitó ocasionalmente durante 1 h y se precipitaron las proteínas con 5 volúmenes de acetona fría durante una noche. Se centrifugó a 27,000 x g durante 15 min a 4°C para retirar la acetona y se realizaron dos lavados más con acetona al 80% y 60% v/v respectivamente, centrifugando a 27,000 x g durante 15 min a 4°C. La acetona se dejó evaporar a temperatura ambiente.

V.9. Separación de la proteína ribosomal S6 por cromatografía de afinidad.

Para la separación por cromatografía de afinidad de la PRS6 de maíz, se siguió el método descrito por Beltran-Peña y colaboradores (2002), se diluyeron 500 μg de proteínas ribosomales en 300 μL de buffer A (Tris HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet-P 40 0.05% p/v) con 2 mM de benzamidina y 1 μM de PMSF. El extracto diluido se mezcló con 16 μL de anticuerpo anti S6 (Santacruz no. Catálogo 13005) en una dilución de 1:200 y la mezcla se incubó toda la noche a 4°C con agitación constante. A continuación, se le adicionaron 300 μL de proteína A-sefarosa y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h más. La mezcla se hizo pasar a través de una punta de micropipeta taponada con fibra de vidrio y la microcolumna se lavó cinco veces con buffer B (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 1 mM, EDTA 1 mM, Nonidet-P40 0.05% p/v, Triton X-100 0.25% p/v) y cuatro veces con el buffer A, 100 μL en cada lavado. Finalmente, la proteína S6 se eluyó de la columna con la mezcla de 50 μL de buffer de muestra 5 X (Tris 0.05 M, pH 6.8, EDTA 0.02 M, Glicerol 20% p/v), 5 μL de β -mercaptoetanol y 445 μL de H_2O .

V.10. Análisis de las formas fosforiladas de ZmS6K y PRS6 en radícula de maíz.

Las distintas formas fosforiladas de S6K y de PRS6 se analizaron por isoelectroenfoque (IEF) utilizando tiras ReadyStrip de BIO-RAD de un pH de 3 – 10. Las tiras de gradiente inmovilizado de pH (IPG) se rehidrataron de manera pasiva de 11 a 15 h con una solución de 100 µg de las proteínas inmunoprecipitadas de los extractos crudos obtenidos de las radículas llevados a un volumen total de 125 µL con buffer de rehidratación ([8 M urea, CHAPS 4% p/v, 100 mM DTT pH 7.35]. Las tiras IPG se enfocaron en el aparato PROTEAN IEF Cell (BioRad modelo Cell USA) con las siguientes condiciones: un enfoque lineal con un voltaje inicial 0, voltaje final 4000 V, con 8-10,000 V-h. Las tiras enfocadas se fijaron en una solución de ácido acético 10% v/v y etanol 10% v/v durante toda la noche, se lavaron en agua destilada durante 20 min, se añadió DTT al 0.0005% p/v durante 30 min y se añadió finalmente nitrato de plata al 0.2% p/v durante 30 min. Posteriormente, las tiras se lavaron en agua destilada durante 5 min y se revelaron con una mezcla de bicarbonato de sodio al 3.5% p/v y formaldehído 0.05% v/v, la reacción se detuvo con ácido acético al 3% v/v. Finalmente, las tiras se lavaron con ácido acetilsalicílico 1 M pH 6 y se secaron a temperatura ambiente. Para observar la incorporación de [³²P]-ortofosfato (bandas fosforiladas con marca radiactiva), las tiras se expusieron en un Phosphorimager (Marca BIO-RAD, Modelo GS-525) durante tres días y posteriormente se expusieron a una película Kodak (No. de catálogo 601 1597).

V.11. Determinación de la cinética de la ZmS6K.

La ZmS6K obtenida por inmunoseparación de tejidos tratados con auxinas o insulina se utilizó para medir su actividad y realizar el análisis cinético. La mezcla de sefarosa–proteína A–proteína inmunoprecipitada, se centrifugó en una microcentrífuga con un pulso de 20 segundos. El sobrenadante se retiró y la pastilla que contenía la mezcla sefarosa–proteína A–anticuerpo–ZmS6K se lavó tres veces con buffer B (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, NaCl 1 mM, Nonidet-P 40 0.05 % p/v, Triton X-100 0.25% p/v), a continuación se lavó dos veces con buffer A (Tris HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet-P 40 0.05% p/v) y se resuspendió en 100 μ L de buffer de reacción [MOPS 50 mM, pH 7.0, cloruro de magnesio 5 mM, DTT 1 mM, p-nitrofenil fosfato 10 mM y vanadato de sodio 1 mM]. Para medir la actividad de la ZmS6K se utilizaron 10 μ L de la mezcla sefarosa–proteína A anticuerpo–enzima y se le agregó ATP frío a diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400 y 500 μ M), 10 μ Ci de [32 P]–ATP (10 Ci/mmol), inhibidor PKA 0.5 μ M, inhibidor PKC 4 μ M y 5 μ g de péptido RSK (péptido sintético que contiene los sitios fosforilables de la S6), en un volumen de reacción final de 20 μ L. Para detener la reacción se transfirieron los 20 μ L de la misma a discos secos de papel p81 (fosfocelulosa). Los papeles se lavaron exhaustivamente con ácido fosfórico al 0.85% (v/v) y finalmente con acetona. La incorporación de [32 P]–ortofosfato en el péptido RSK se determinó colocando el papel en un vial con líquido de centelleo y midiendo la marca radiactiva en un contador de centelleo líquido. Para determinar la K_m de la ZmS6K para el ATP, se utilizaron diferentes concentraciones de este compuesto sin marca y una concentración fija de [32 P]– γ –ATP, como se indicó anteriormente.

V.12. Análisis Estadístico.

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces usando extractos de diferentes muestras biológicas. Los datos obtenidos de los bioensayos de crecimiento inducido por auxinas e insulina se sometieron a un análisis ANOVA y a pruebas de análisis de intervalos de Dunnett ($p < 0.05$), usando el programa NCSS (Statistical Analysis Graphics).

VI. RESULTADOS.

VI.1. Curva de dosis respuesta con tratamientos continuos a distintas concentraciones de auxinas.

En el presente trabajo se analizó el efecto del tratamiento continuo durante 4 días con dosis de AIA de 0.001 a 10 μM en el crecimiento de las radículas de maíz. En la figura 5 se presentan estos resultados. En todas las dosis analizadas se observó una inhibición en el crecimiento de las radículas de los ejes embrionarios de maíz en los tratamientos con auxinas con respecto al testigo. La inhibición del crecimiento de la radícula aumenta al incrementarse la dosis de auxinas y el tiempo de tratamiento; por lo que la mayor inhibición se encontró a la dosis de 10 μM y a las 120 horas de tratamiento.

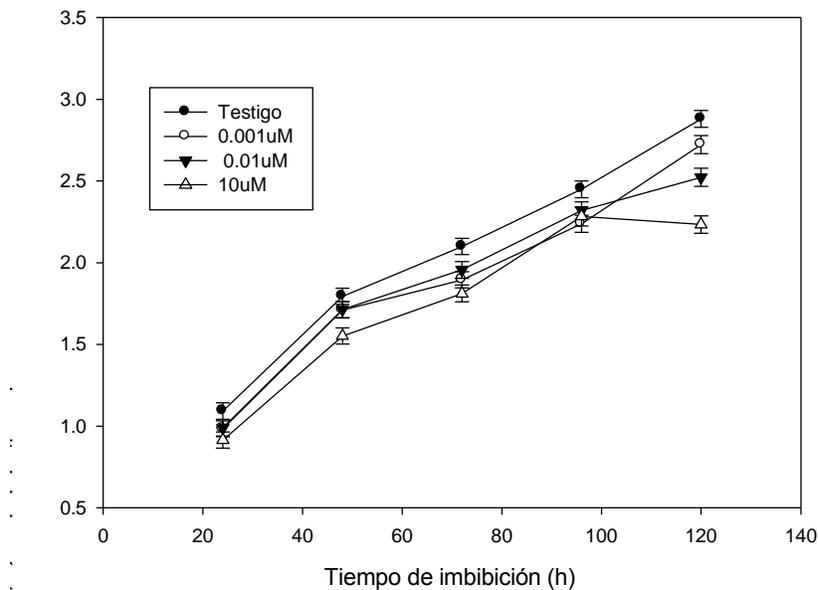


Figura 5. Crecimiento de las radículas de maíz en respuesta a tratamientos continuos con AIA a distintas concentraciones.

Con base en los resultados anteriores se decidió no usar un tratamiento continuo de auxinas, y en su lugar aplicar un tratamiento con pulsos de 2 horas de auxinas, en

concentraciones similares y ligeramente superiores a las del experimento anterior (2, 10 y 15 μM), para evaluar el efecto de estos tratamientos en el crecimiento de las radículas de maíz.

VI.2. Curva de dosis respuesta con pulso de dos horas a distintas concentraciones de auxinas.

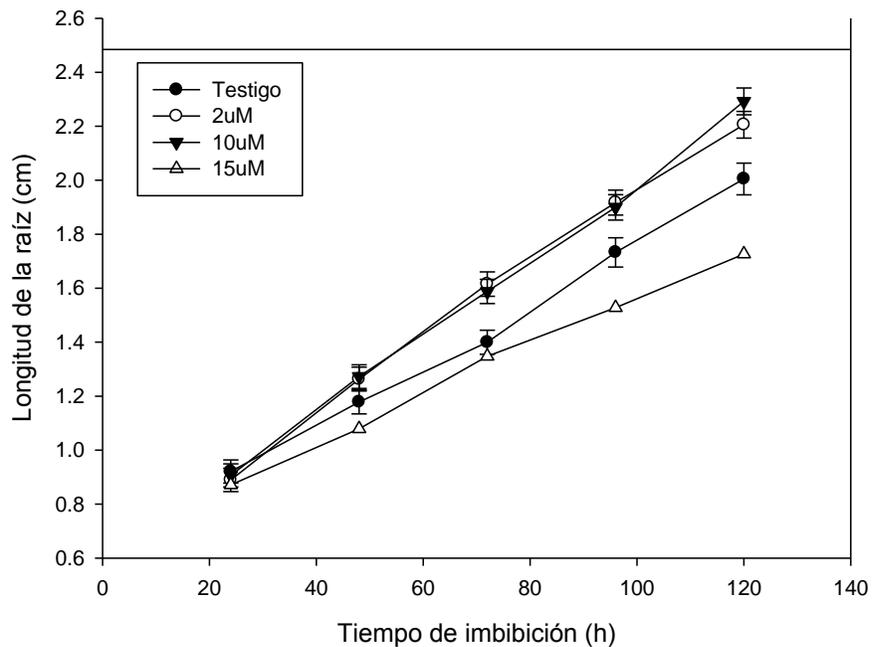


Figura 6. Crecimiento de las radículas de maíz en respuesta a tratamientos con pulsos de dos horas con AIA a distintas concentraciones.

En la figura 6 se muestra la curva de dosis respuesta con pulsos de 2 h de auxinas a distintas concentraciones. Se puede observar que el crecimiento de las radículas de los ejes embrionarios sometidos a un pulso de 2 h con las concentraciones de 2 y 10 μM de AIA es significativamente mayor al del testigo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambas concentraciones. Por otra parte, la aplicación de un pulso de 15 μM de AIA inhibió el crecimiento de la radícula.

A partir de estos resultados, se decidió realizar los experimentos para analizar el efecto de la auxina AIA en la enzima S6K y en la proteína ribosomal S6 con un tratamiento de pulso de auxinas con una concentración de 10 μM .

VI.3. Crecimiento de radículas de maíz en respuesta a un pulso de insulina (200 $\mu\text{U}/\text{mL}$).

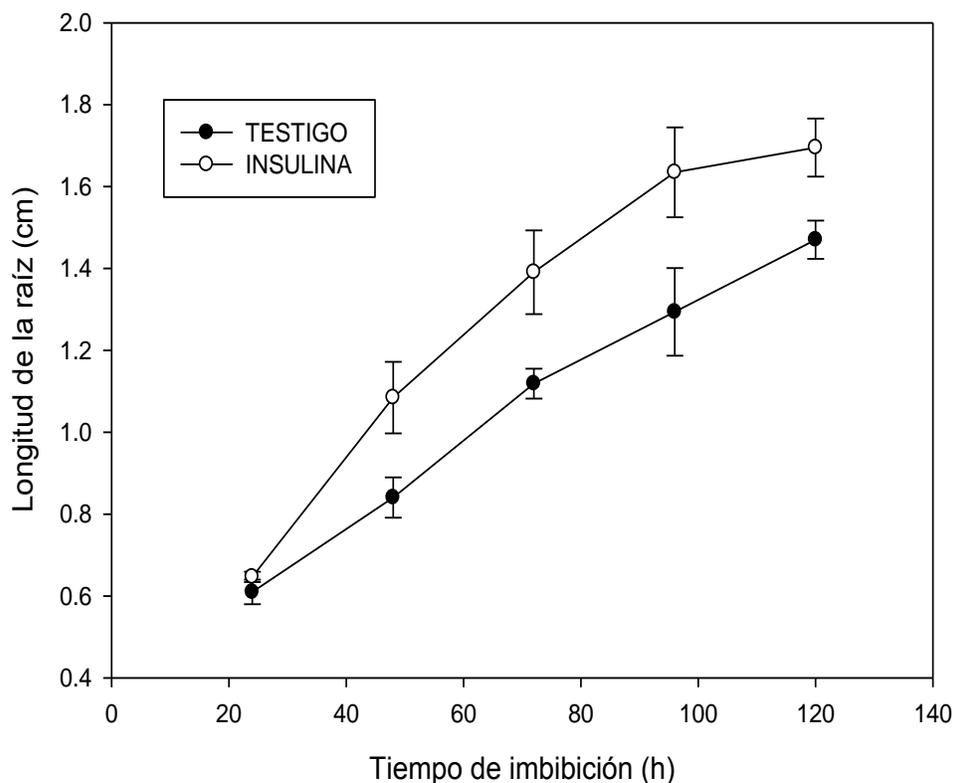


Figura 7. Crecimiento de las radículas de maíz en respuesta a un pulso de dos horas con insulina (200 $\mu\text{U}/\text{mL}$).

En la figura 7 se presenta el crecimiento de las radículas de maíz en respuesta a un tratamiento con un pulso de dos horas (22-24 h de imbibición) con insulina (200 $\mu\text{U}/\text{mL}$). Se puede observar que el crecimiento de las radículas de los ejes embrionarios tratados con insulina es significativamente mayor al del testigo. La

inducción del crecimiento por efecto de la insulina se observó a partir de las 48 horas de tratamiento.

Al comparar la inducción del crecimiento de radículas de maíz con auxinas o insulina se puede observar que, en promedio, el AIA indujo un crecimiento 15% superior al del testigo (100%), mientras que en el tratamiento con insulina se observó una inducción del crecimiento de aproximadamente un 30% (Figuras 6 y 7).

VI.4. Aislamiento de la proteína ZmS6K de radículas de maíz.

La proteína ZmS6K de radículas de maíz se aisló mediante inmunoseparación a partir de extractos crudos de radículas de maíz disectadas de los ejes embrionarios germinados durante 24 horas y sometidos a los distintos tratamientos. La inmunoseparación se realizó utilizando un anticuerpo comercial contra la p70S6K de humano. En la Figura 8 se presentan las proteínas de radículas de maíz inmunoseparadas con el anticuerpo contra S6K con los distintos tratamientos y se observa que en todos los tratamientos el peso molecular de la proteína aislada es de 62 kDa.

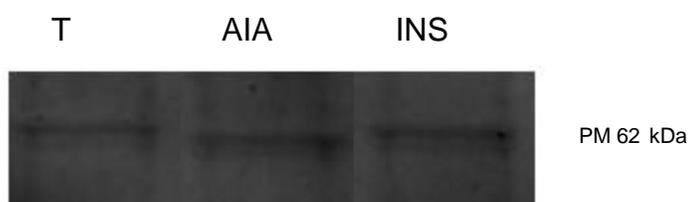


Figura 8. Proteína ZmS6K inmunoseparada de radículas de maíz de tratamientos testigo, con pulso de auxina 10 μ M o con pulso de insulina (200 μ U/mL). Las proteínas aisladas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (p/v) y se cargaron con 15 μ g de proteína de cada tratamiento T= Testigo, AIA= Auxinas, INS= Insulina.

VI.5. Efecto de insulina y AIA en la fosforilación de ZmS6K en radículas de maíz.

La determinación de la fosforilación de ZmS6K en respuesta a insulina y AIA se realizó inmunoseparando la proteína ZmS6K fosforilada en presencia de [^{32}P]-ortofosfato con el anticuerpo p70S6K de humano. Los tratamientos con AIA o insulina indujeron un incremento significativo en la incorporación de [^{32}P]-ortofosfato en la proteína ZmS6K inmunoseparada (Figura 9). Se puede observar que el incremento en la fosforilación con respecto al testigo es superior con AIA (228%) que con insulina (128%).

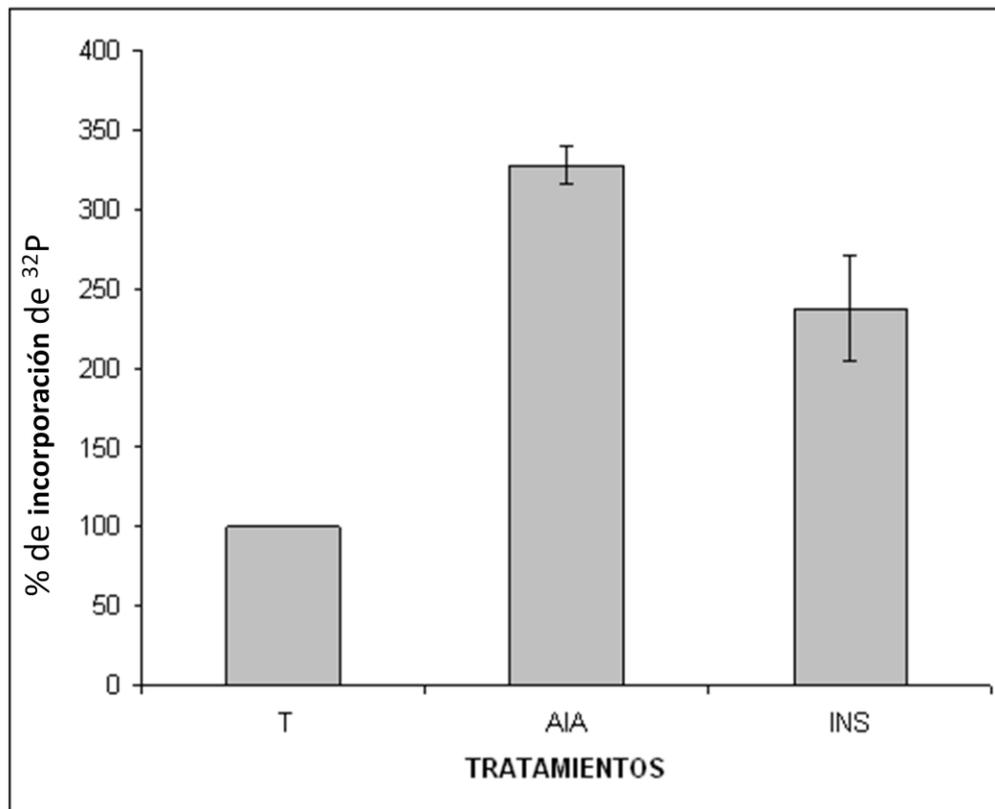


Figura 9. Efecto de los tratamientos testigo (T), con auxina (AIA) o con insulina (INS) en la incorporación de [^{32}P]-ortofosfato en la proteína ZmS6K de radículas de maíz. Se presentan las medias y desviación estándar de los tres experimentos realizados con cada tratamiento.

VI.6. Análisis de las formas fosforiladas de ZmS6K en radículas de maíz.

La determinación de las distintas formas fosforiladas de ZmS6K en respuesta a insulina y AIA se realizó con la proteína ZmS6K fosforilada en presencia de [³²P]-ortofosfato e inmunoseparada con el anticuerpo p70S6K de humano. Posteriormente, las proteínas inmunoseparadas se sometieron a un isoelectroenfoque utilizando tiras IpG de BIORAD con un rango de pH de 3-10. La detección de las formas fosforiladas se realizó exponiendo las tiras IpG en un Phosphorimager. Los resultados se presentan a continuación.

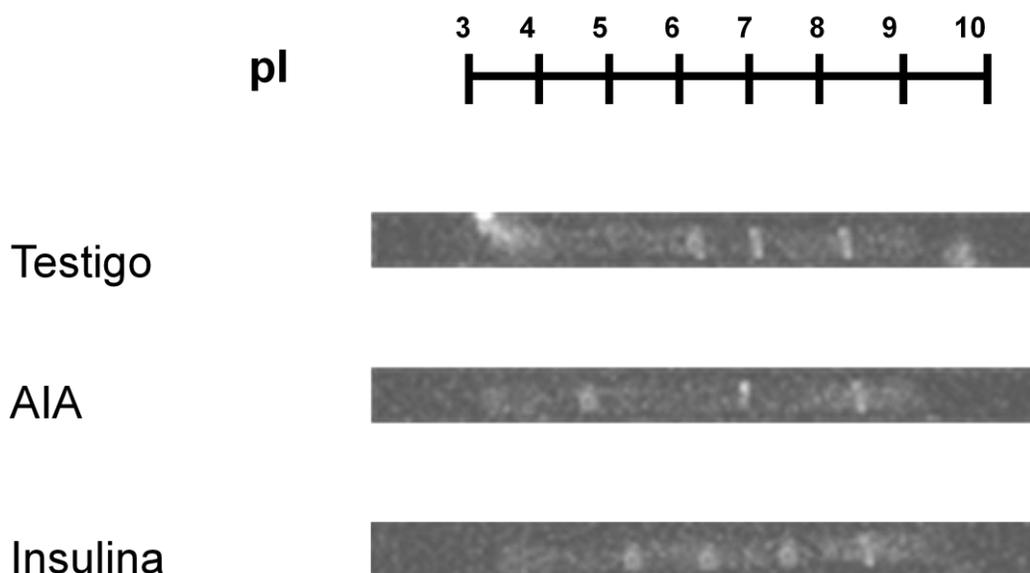


Figura 10. Formas fosforiladas de ZmS6K en radículas de maíz de los distintos tratamientos (testigo, insulina y auxina). Se presentan los resultados representativos de uno de los tres experimentos realizados, en todos ellos se obtuvieron los mismos resultados.

En la figura 10 se puede observar que tanto en el testigo como en el tratamiento con auxinas, se encontraron tres formas fosforiladas, mientras que en el tratamiento con insulina se encontraron cuatro formas fosforiladas.

En la tabla 1 se presentan los valores de los puntos isoeléctricos para cada una de las formas fosforiladas en los distintos tratamientos.

Tabla 1. Valores de los puntos isoeléctricos de las formas fosforiladas de ZmS6K.

Tratamiento	Puntos Isoeléctricos (pI)			
Testigo	6.3	7	8.3	
AIA	5		7	8.3
Insulina	5.5	6.3	7.5	8.3

En el testigo, las formas fosforiladas presentan valores de pI de aproximadamente 6.3, 7 y 8.3. En el caso de las auxinas, los valores de pI de las formas fosforiladas son de aproximadamente 5, 7 y 8.3; mientras que en el tratamiento con insulina, las cuatro formas fosforiladas encontradas presentan valores de pI de aproximadamente 5.5, 6.3, 7.5 y 8.3. Se puede observar que en todos los tratamientos se encuentra una forma fosforilada común, con pI de 8.3. Esta forma correspondería a la forma menos fosforilada de la enzima. Aunque en el testigo y en el tratamiento con auxinas se encontraron tres formas fosforiladas, dos de ellas con pI similares (7 y 8.3), las auxinas indujeron una forma más ácida (con pI 5), que probablemente indicaría una mayor fosforilación que la forma de pI 6.3 observada en el testigo (ésta, a su vez, no se detecta con auxinas). Por otra parte, en el tratamiento con insulina dos de las cuatro formas detectadas se observan también en el testigo (pI 8.3 y 6.3) y aparecen dos nuevas formas, una de las cuales es más ácida que las que se encuentran en el testigo (pI 5.5) y la otra (pI 7.5) tiene un valor intermedio entre las encontradas en el testigo (pI 7 y pI 8.3).

VI.7. Análisis cinético de la actividad de la ZmS6K.

Para comprobar si la mayor fosforilación de ZmS6K inducida por auxinas e insulina (con pl de 5 y 5.5) (Figura 10) se reflejaba en una mayor actividad de la enzima, se midió la actividad cinasa de ZmS6K utilizando la enzima inmunoseparada (con las distintas formas fosforiladas), de los diferentes tratamientos con el sustrato artificial RSK (que contiene el sitio activo de la PRS6) y concentraciones variables del sustrato [32 P]- γ -ATP. Como se indica en la metodología, la determinación de la actividad de ZmS6K se realizó en presencia de inhibidores de las cinasas PKA y PKC, para evitar que dichas cinasas pudieran fosforilar el sustrato usado. A partir de estos resultados se realizó el análisis cinético. Los valores de $K_{m_{ap}}$ y $V_{max_{ap}}$ de la ZmS6K de cada uno de los tratamientos, se obtuvieron a partir de las gráficas de Lineweaver-Burk ($1/V$ contra $1/[S]$). A continuación se presentan los resultados obtenidos (Figuras 11 a 13).

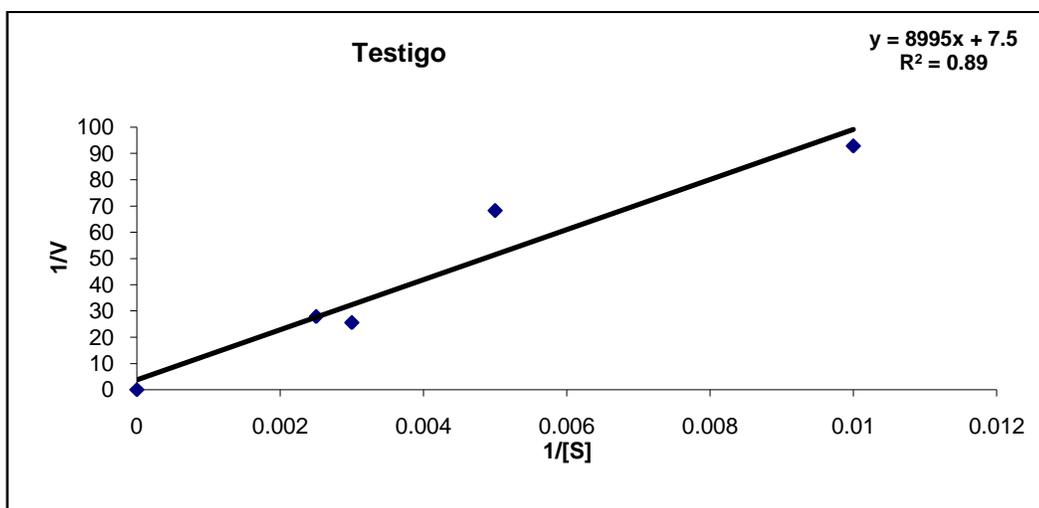


Figura 11. Gráfica de Lineweaver-Burk de la actividad de la enzima ZmS6K extraída de radículas testigo. Se presentan los resultados representativos de uno de los tres experimentos realizados.

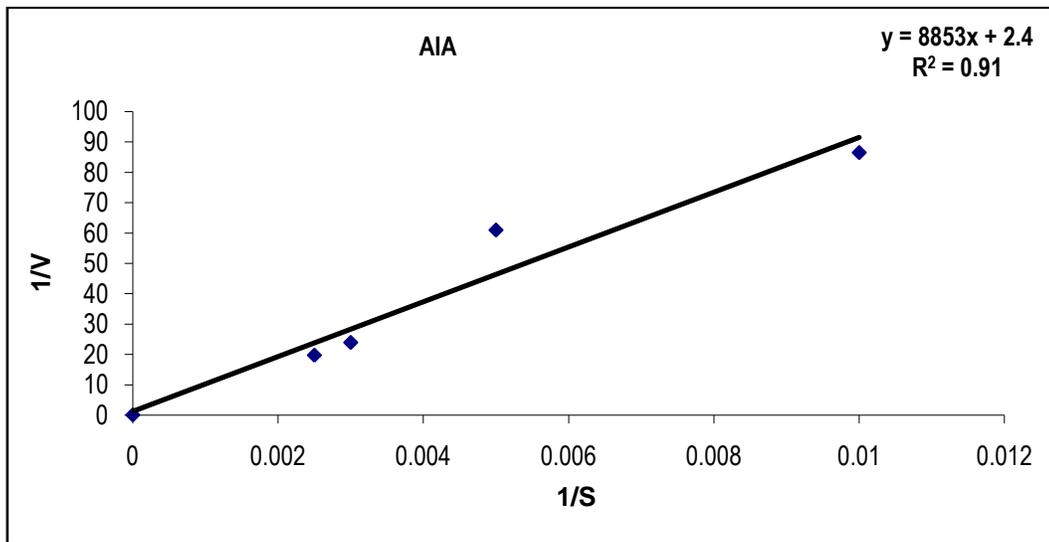


Figura 12. Gráfica de Lineweaver-Burk de la actividad de la enzima ZmS6K extraída de radículas tratadas con un pulso de AIA 10 μM . Se presentan los resultados representativos de uno de los tres experimentos realizados.

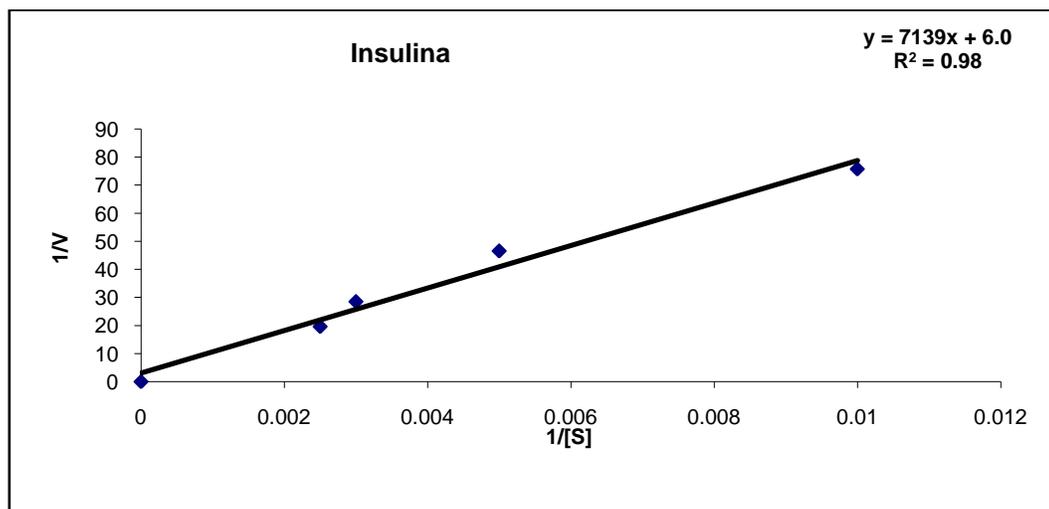


Figura 13. Gráfica de Lineweaver-Burk de la actividad de la enzima ZmS6K extraída de radículas tratadas con un pulso de insulina 200 $\mu\text{U/mL}$. Se presentan los resultados representativos de uno de los tres experimentos realizados.

Tabla 2. Valores de $K_{m_{ap}}$ y $V_{max_{ap}}$ de ZmS6K extraída de radículas de maíz con los diferentes tratamientos. Se presentan las medias y desviación estándar de los tres experimentos realizados con cada tratamiento.

ANÁLISIS CINÉTICO DE ZmS6K		
TRATAMIENTOS	$K_{m_{ap}}$ (μ M)	$V_{max_{ap}}$ (pmoles/min)
TESTIGO	1207 ± 18	$134.2 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$
AIA	3740 ± 53	$422.4 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-3}$
INSULINA	1205 ± 21	$166.5 \times 10^{-3} \pm 6 \times 10^{-3}$

En la tabla 2 se observa que en el tratamiento testigo se encontró un valor de $K_{m_{ap}}$ para ATP de 1207 μ M en radículas de maíz. El valor de $V_{max_{ap}}$ encontrado para la enzima de radícula del tratamiento testigo fue de 134 pmoles/min. El tratamiento con insulina no afectó la K_m aparente para ATP; mientras que el tratamiento con auxina la incrementó significativamente indicando una disminución en la afinidad por este sustrato. Por otra parte, la $V_{max_{ap}}$ aumentó significativamente en los tratamientos con AIA e insulina con respecto al testigo, aunque el incremento fue mucho mayor en presencia de auxinas. Estos resultados son consistentes con el aumento en la fosforilación de la ZmS6K observado en estos tratamientos.

VI.8. Efecto de insulina y AIA en la fosforilación de ZmPRS6.

La determinación de la fosforilación de ZmPRS6 en respuesta a insulina y AIA se realizó inmunoseparando la proteína ZmPRS6 fosforilada en presencia de [32 P]-ortofosfato con el anticuerpo anti S6 para humanos. En la figura 14 se observa que los tratamientos con AIA o insulina indujeron un incremento significativo en la incorporación de [32 P]-ortofosfato en la proteína ZmPRS6 inmunoseparada (47% y 76% respectivamente) con respecto al testigo (100%). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la inducción de la fosforilación de ZmPRS6 entre los tratamientos con AIA o insulina.

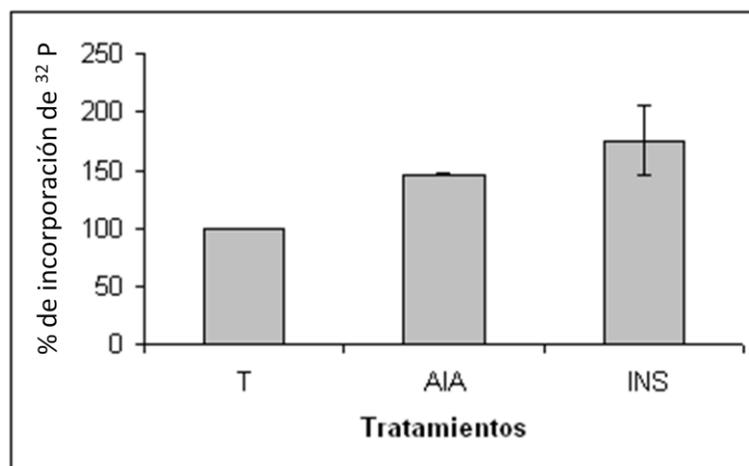


Figura 14. Efecto de los tratamientos testigo (T), con auxina (AIA) o con insulina (INS) en la incorporación de [^{32}P]-ortofosfato en la proteína ZmPRS6 de radículas de maíz. Se presentan las medias y desviación estándar de los tres experimentos realizados con cada tratamiento.

VI.9. Análisis de las formas fosforiladas de la proteína ribosomal S6 en radículas de maíz.

Para el análisis de las formas fosforiladas de la proteína ribosomal S6, se obtuvieron los extractos crudos de las radículas disectadas de los ejes embrionarios, se inmunoseparó la proteína ZmPRS6 fosforilada en presencia de [^{32}P]-ortofosfato con el anticuerpo S6 de humano. Posteriormente, las proteínas inmunoseparadas se sometieron a un isoelectroenfoque utilizando tiras IpG con un rango de pH de 3-10, de forma similar a lo que se hizo con la proteína ZmS6K. La detección de las formas fosforiladas se realizó exponiendo las tiras IPG en un Phosphorimager. Los resultados se presentan a continuación.

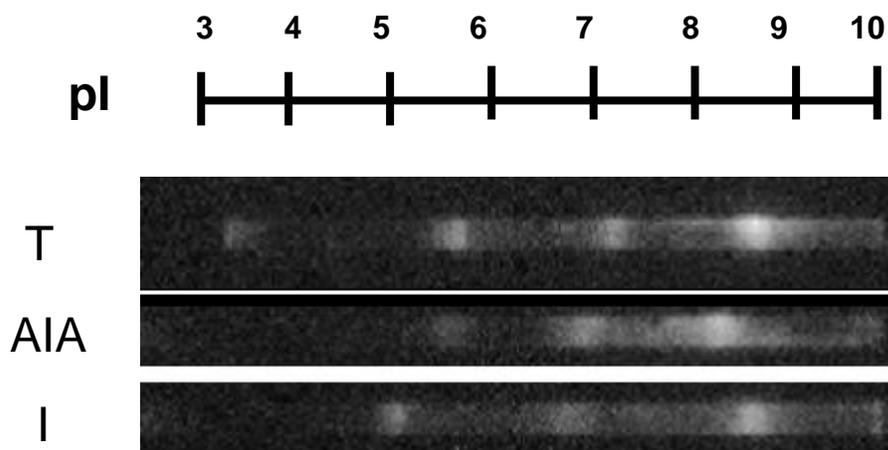


Figura 15. Formas fosforiladas de ZmPRS6 en radículas de maíz de los distintos tratamientos testigo (T), auxina (AIA) e insulina (INS). Se presentan los resultados representativos de uno de los tres experimentos realizados, en todos ellos se obtuvieron los mismos resultados.

Tratamiento	Puntos Isoeléctricos (pI)		
Testigo	5.5	7.1	8.7
AIA	5.5	6.8	8.5
Insulina	5.0	6.6	8.7

Tabla 3. Valores de los puntos isoeléctricos de las formas fosforiladas de ZmPRS6.

En la figura 15 se puede observar que en los tres tratamientos se encontraron tres formas fosforiladas. En la literatura, en otros organismos, se han reportado entre 4 y 5 sitios susceptibles de ser fosforilados. En la tabla 3 se presentan los valores de los puntos isoeléctricos para cada una de las diferentes formas fosforiladas en radículas de maíz para cada tratamiento. En el testigo, los valores de pI de las formas fosforiladas encontradas fueron de 5.5, 7.1, y 8.7. Con AIA las formas fosforiladas presentaron valores de pI de 5.5, 6.8 y de 8.5, mientras que con la insulina los valores de pI de las formas fosforiladas fueron de 5, 6.6 y 8.7. Se observa que aún cuando con los tres tratamientos se obtuvieron tres diferentes formas fosforiladas, los valores de pI varían y sólo se encuentran algunas formas comunes entre ellos. La forma con pI de 8.7 corresponde a la forma menos fosforilada y se encuentra en

el tratamiento testigo y en el tratamiento con insulina. Sin embargo, la insulina produjo dos formas más ácidas (pI 6.6 y 5), que podrían corresponder respectivamente a una mayor fosforilación de las formas con pI de 7.1 y 5.5 detectadas en el testigo. Por otra parte, las auxinas presentan la forma con pI de 5.5 que se detecta también en el testigo. Sin embargo, producen dos formas con pI de 8.5 y 6.8, que podrían corresponder respectivamente a una mayor fosforilación de las formas con pI de 8.7 y 7.1 observadas en el testigo.

VII. DISCUSIÓN.

La vía de señalización regulada por factores de crecimiento, hormonas y nutrientes y que da como resultado la activación de la p70S6K y la fosforilación de la PRS6 se encuentra ampliamente estudiada en animales (Fingar y Blenis, 2004; Averous y Proud, 2006; Ruvinsky y Meyuhas, 2006; Proud, 2007b; Dann y col, 2007; Selman y col., 2009). En los últimos años, se han identificado algunos de los intermediarios de dicha vía en plantas (TOR y S6K, entre otros) y su inducción por hormonas vegetales, lo que apoya la participación de esta ruta en la regulación del crecimiento en plantas (Turck y col., 2004; Anderson y col., 2005; Mahfouz y col., 2006; Deprost y col., 2007). En particular, en ejes embrionarios de maíz también se han identificado componentes de la vía PI3K-TOR y se ha reportado la regulación de la fosforilación de PRS6 por auxinas e insulina (Dinkova y col., 2000; Sánchez de Jiménez, 2000; García-Flores y col., 2001; Beltrán-Peña y col., 2002; Reyes de la Cruz y col., 2004; Agredano-Moreno y col., 2007; Dinkova y col., 2007). En el presente trabajo, se estudió el efecto de auxinas e insulina en la fosforilación y actividad de ZmS6K y en la fosforilación de PRS6 en radículas de semillas de maíz en germinación, por ser las radículas uno de los primeros tejidos en activarse durante la imbibición de semillas quiescentes.

En reportes previos se encontró que el crecimiento de la radícula en respuesta a auxinas tiene un comportamiento bifásico: a dosis muy bajas (cerca de 0.1 nM) se promueve el crecimiento y a dosis mayores se inhibe (Moore, 1989). En un estudio más reciente, Woodward y Bartel (2005) encontraron en plantas de *Arabidopsis* que el tratamiento con dosis superiores a 0.1 nM de la auxina AIA durante 6 días inhibe el crecimiento de las radículas. En el presente trabajo se encontró que tratamientos continuos con AIA en dosis desde 1 nM (0.001 µM) a 10 µM inhiben el crecimiento de las radículas de maíz. La inhibición se incrementó al aumentar la dosis y el tiempo de tratamiento con auxinas (Figura 5).

Por otra parte, al dar tratamientos con pulsos de 2 h de auxinas (2 y 10 μM) se observó un incremento del crecimiento de aproximadamente 15% con respecto al testigo, mientras que el efecto fue inhibitorio con concentraciones superiores (Figura 6).

En trabajos previos (García-Flores y *col.*, 2001; Reyes de la Cruz y *col.*, 2004) se ha estudiado el efecto de la insulina (200 $\mu\text{U}/\text{mL}$) sobre el crecimiento y la regulación de la síntesis de proteínas en ejes embrionarios de maíz en germinación. Al analizar por separado el efecto de la insulina en el crecimiento del coleoptilo y de la radícula, se observó que induce el crecimiento en ambas partes del eje embrionario (García-Flores y *col.*, 2001). En el presente trabajo se observó que el tratamiento con pulsos de insulina de 200 $\mu\text{U}/\text{mL}$ indujo un incremento significativo, de aproximadamente el 30%, sobre el crecimiento de las radículas de maíz (Figura 7).

A partir de estos resultados, se decidió realizar experimentos para analizar los efectos de AIA o insulina sobre la fosforilación y actividad de la enzima ZmS6K y la fosforilación de la PRS6 de radículas, con un tratamiento de pulso de auxinas (concentración de 10 μM) y un pulso de 200 $\mu\text{U}/\text{mL}$ en el caso de la insulina.

Se observó que la proteína ZmS6K aislada de las radículas de maíz en los distintos tratamientos tuvo un peso molecular de 62 kDa (Figura 8), tal como se había reportado previamente para la proteína aislada de ejes embrionarios de maíz (Reyes de la Cruz y *col.*, 2004).

Para determinar el efecto de los tratamientos con auxinas o insulina en la fosforilación de ZmS6K, se aplicaron los tratamientos en presencia de [^{32}P]-ortofosfato. En la figura 9 se puede observar que ambos tratamientos indujeron un incremento en la fosforilación de esta proteína con respecto al testigo, aunque la fosforilación fue superior con AIA (228%) que con insulina (128%).

Al analizar mediante isoelectroenfoque las formas fosforiladas de ZmS6K, se puede observar que los tratamientos con auxinas e insulina produjeron formas fosforiladas más ácidas, lo que indicaría un mayor grado de fosforilación con respecto al testigo (Figura 10). Estos resultados concuerdan con la mayor incorporación de [³²P]-ortofosfato en la ZmS6K inmunoseparada procedente de los tratamientos con auxinas o insulina (Figura 9). En este sentido, se ha reportado que la fosforilación de S6K en animales incrementa su actividad cinasa (Thomas, 2002). Sin embargo, cada uno de los efectores produjo algunas formas fosforiladas distintas, lo cual sugiere que la proteína ZmS6K es estimulada por estos efectores en forma diferencial, utilizando probablemente diferentes vías de transducción de señales. En estudios previos se ha demostrado que la fosforilación de ZmS6K en los ejes embrionarios de maíz completos ocurre a través de la vía de transducción de señales PI3K-TOR (Reyes de la Cruz, 2004; Dinkova y col., 2007). Como se mencionó en los antecedentes, se han identificado en la enzima S6K de animales ocho sitios susceptibles de ser fosforilados (Tre²²⁹, Ser³⁷¹, Tre³⁸⁹, Ser⁴⁰⁴, Ser⁴¹¹, Ser⁴¹⁸, Tre⁴²¹ y Ser⁴²⁴) (Ferrari y col., 1992; Pearson y col., 1995; Dennis y col., 1998; Averous y Proud, 2006). Por lo que se sugiere que si estos sitios están conservados en maíz, las diferentes formas fosforiladas de ZmS6K observadas en los tratamientos con auxinas o insulina podrían deberse a la fosforilación diferencial de los diversos residuos de aminoácidos susceptibles de ser fosforilados, lo que provocaría una activación distinta de la ZmS6K. En mamíferos, la fosforilación mediada por TOR implica múltiples sitios de fosforilación y es esencial para la activación de S6K (Han y col., 1995; Pearson y col., 1995; Burnett y col., 1998; Saitoh y col., 2002). Por otra parte, Reyes de la Cruz (2004) encontró al analizar la secuencia deducida del gen de la ZmS6K de ejes embrionarios completos con el programa ScanProsit (Expassy Molecular Biology Server) la presencia de 4 sitios putativos de N-glicosilación y 4 de N-miristilación. Estas posibles modificaciones postraduccionales podrían también contribuir a explicar, junto con las modificaciones por fosforilación, las distintas formas fosforiladas encontradas en los diferentes tratamientos.

En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, se analizaron las formas fosforiladas de ZmS6K en coleoptilos de maíz tratados con auxinas o insulina. Si se comparan las formas fosforiladas presentes en los tratamientos con auxinas o insulina en los coleoptilos de semillas de maíz en germinación con las encontradas en los tratamientos del presente estudio, se encuentra que los valores de puntos isoeléctricos no corresponden en ningún caso, lo que sugiere que la respuesta a los efectores analizados es tejido específica. Asimismo, los resultados del estudio en coleoptilos de maíz indican que las auxinas o insulina estimulan el crecimiento a través de distintas vías de transducción, ya que aunque confluyen en la fosforilación de ZmS6K y de la PRS6, dan resultados distintos en la regulación de la síntesis de proteínas (Buentello y *col.*, comunicación personal).

En el análisis cinético se obtuvieron los valores de $K_{m_{ap}}$ y $V_{max_{ap}}$ de la enzima ZmS6K obtenida mediante inmunoseparación (Tabla 2, Figuras 11 a 13). El valor de $K_{m_{ap}}$ para ATP fue de 1207 μ M en el tratamiento testigo en radículas de maíz, aproximadamente 3.5 veces superior al reportado en ejes embrionarios completos de maíz (Reyes de la Cruz, 2004) y aproximadamente 3 veces superior al observado en coleoptilos de maíz (Buentello y *col.*, comunicación personal). En relación al valor de $V_{max_{ap}}$ encontrado en la enzima de radícula del tratamiento testigo, fue de 134 pmoles/min, un valor superior al reportado en ejes embrionarios completos (Reyes de la Cruz, 2004) y similar al encontrado en coleoptilos de maíz (Buentello y *col.*, comunicación personal). Se observó que la $V_{max_{ap}}$ aumentó significativamente en los tratamientos con AIA e insulina con respecto al testigo, aunque el incremento fue mucho mayor en presencia de auxinas; como sería de esperarse por el aumento en la fosforilación de la ZmS6K observado en estos tratamientos. Por otra parte, el tratamiento con insulina no afectó la $K_{m_{ap}}$ para ATP; mientras que el tratamiento con auxina incrementó significativamente la $K_{m_{ap}}$ (aproximadamente 3 veces), sugiriendo una disminución en la afinidad por el sustrato ATP. Estos resultados indican que la enzima de radícula tiene una mayor velocidad que la(s) enzima(s) aisladas de ejes embrionarios completos o de coleoptilos. Estos resultados requieren profundizarse,

con la enzima purificada de las distintas fuentes para verificar los efectos de los tratamientos en los parámetros cinéticos de la enzima S6K y comprender su función regulatoria.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan la propuesta de que la fosforilación de ZmS6K inducida por AIA e insulina se realiza por distintas vías de transducción de señales, ya que los patrones de fosforilación y la actividad de ZmS6K que se obtienen son diferentes. Los datos también apoyan la propuesta de que la respuesta es tejido específica, ya que los resultados obtenidos con radículas difieren de los reportados en ejes completos y coleoptilos de maíz.

Los tratamientos con AIA o insulina indujeron un incremento significativo (47% y 76%, respectivamente) en la fosforilación de la proteína ZmPRS6 con respecto al testigo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos (Figura 14). Al analizar las formas fosforiladas de ZmPRS6, se puede observar que, en forma similar a lo que se encontró con la enzima ZmS6K, las auxinas y la insulina produjeron formas fosforiladas más ácidas de la ZmPRS6, lo que indicaría un mayor grado de fosforilación con respecto al testigo (Figura 15). Las distintas formas fosforiladas encontradas en los distintos tratamientos corresponderían a distintos grados de fosforilación de los residuos de serina y treonina de esta proteína. Como se mencionó en los antecedentes, se ha reportado que el grado de fosforilación de la PRS6 en plantas se regula en respuesta a estrés ambiental y durante el desarrollo. En particular, el estrés por calor disminuyó la fosforilación de PRS6 (Scharf y Nover, 1982; Turck y *col.*, 1998). Williams y colaboradores (2003) analizaron la fosforilación de ZmPRS6 en ápices de radículas de maíz de 4-5 días de germinación en plantas sometidas a distintos tipos de estrés (anoxia, exceso de oxígeno, choque térmico, frío, salino y osmótico). Las formas de PRS6 fueron determinadas usando un sistema de electroforesis bidimensional especializado y confirmadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Los autores describieron que la ZmPRS6 de raíces posee en su extremo carboxilo

terminal cinco residuos susceptibles de ser fosforilados (Ser²³⁸, Ser²⁴¹, Ser²⁴⁷, Tre²⁵⁰ y Ser²⁵¹). Asimismo, estos autores encontraron que la acumulación de formas hiperfosforiladas con fosfo-Ser²³⁸ disminuía en respuesta al estrés con choque térmico y anoxia, mientras que estas formas fosforiladas se acumulaban en respuesta al frío. Tanto el estrés salino como el osmótico no produjeron resultados reproducibles. Estos autores concluyeron que las formas fosforiladas encontradas son resultado de la fosforilación secuencial de los residuos de aminoácidos susceptibles de ser fosforilados en la PRS6, lo que a su vez depende de la actividad diferencial de fosfatasas y cinasas presentes en las células. En particular, sus resultados sugieren que la fosforilación secuencial de la Ser²³⁸ y Ser²⁴¹ está regulada por la vía de señalización de PI3K (Williams y *col.*, 2003). Estos antecedentes y los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan la propuesta de que las formas fosforiladas dependen del estímulo aplicado. Sin embargo, no se pueden comparar los resultados de este trabajo con los de Williams y colaboradores ya que ellos no reportaron los puntos isoeléctricos de las formas fosforiladas detectadas. El hecho de que las formas fosforiladas detectadas en este trabajo sean distintas con auxinas e insulina podría indicar que ambos estímulos produjeron una activación diferencial de las cinasas y fosfatasas presentes, debida probablemente a la participación de distintas vías de transducción de cada efector. Por otra parte, si se comparan los pI de este trabajo con los obtenidos previamente en coleoptilos de maíz, se puede observar que con excepción de una forma con pI 8.8 detectada en coleoptilo (semejante a la forma con pI 8.7 observada en radícula), el resto de las formas fosforiladas son distintas en cada parte del eje embrionario, lo que apoya que las respuestas a los efectores estudiados parecen ser tejido específicas.

VIII. CONCLUSIONES.

- Con las dosis y los tiempos de tratamiento seleccionados, la insulina indujo un crecimiento ligeramente superior al de las auxinas en las radículas de maíz en germinación. Aunque la insulina no es una hormona de plantas, se comporta con un homólogo del factor ZmIGF de maíz.
- Ambos efectores (I y AIA) incrementan la fosforilación de la enzima ZmS6K en radículas de maíz, con respecto al testigo, aunque la fosforilación fue mayor con AIA y los patrones de formas fosforiladas son distintos.
- Como se esperaba por el incremento en la fosforilación de ZmS6K, AIA e insulina indujeron un aumento en la $V_{max_{ap}}$ de esta enzima para ATP, mientras que el AIA incrementó la $K_{m_{ap}}$.
- Los tratamientos con auxina o insulina indujeron un incremento en la fosforilación de la ZmPRS6, sustrato de ZmS6K, en radículas de maíz con respecto al testigo. Aunque no se encontraron diferencias significativas en la fosforilación con ambos efectores, los patrones de formas fosforiladas son distintos.
- Los resultados anteriores sugieren que aunque los efectores AIA e insulina/ZmIGF comparten algunos intermediarios, no producen los mismos efectos en la fosforilación de ZmS6K y ZmPRS6, por lo que se sugiere que las vías de transducción de estas señales sean distintas.
- Se requiere profundizar en el estudio de los intermediarios de las vías de señalización de estas hormonas para comprobarlo.
- Por otra parte, se observó que los patrones de formas fosforiladas de ZmS6K y de ZmPRS6 en las radículas de maíz difieren de los encontrados en estudios previos en coleoptilos de maíz.
- La $K_{m_{ap}}$ para ATP de la enzima ZmS6k de radículas de maíz del testigo es superior a la encontrada en eje completo y en coleoptilos.

- Estos datos apoyan la propuesta de que la respuesta a estos efectores es tejido específica, ya que los resultados obtenidos en radículas difieren de los reportados en ejes completos y en coleoptilos de maíz.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

Abel, S. y Theologis, A. 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiology* 111: 9-17.

Agredano-Moreno, L. T., Reyes de la Cruz, H., Martínez-Castilla, L. P. y Sánchez de Jiménez, E. 2007. Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Molecular Biosystems* 3: 794-802.

Anderson, G. H., Veit, B. y Hanson, M. R. 2005. The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biology* 21: 3-12

Anthony, R. G., Henriques, R., Helfer, A., Mészáros, T., Rios, G., Testerink, C., Munnik, T., Deák, M., Koncz, C. y Bögre, L. 2004. A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* 23: 572-581.

Arif, I. y Newman, I.A. 1993. Proton efflux from oat coleoptile cells and Exchange with wall calcium after IAA or fusicoccin treatment. *Planta* 189: 377-383.

Averous, J. y Proud, C. G. 2006. When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene* 25: 6423-6435.

Bailey-Serres, J. 1999. Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends in Plant Science* 4: 142-148.

Barakat, A., Szick- Miranda, K., Chang I. F., Guyot, R., Blanc, G., Cooke, R., Delseny, M. y Bailey Serres, J. 2001. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiology* 127: 398-415.

Barth-Baus, D., Carl A. Stratton, C. A., Parrott, L., Myerson, H., Meyuhas, O., Templeton, D. J., Landreth, G. E. y Hensold, J. O. 2002. S6 phosphorylation-independent pathways regulate translation of 5'-terminal oligopyrimidine tract-containing mRNAs in differentiating hematopoietic cells. *Nucleic Acids Research* 30: 1919-1928.

Beltrán-Peña, E., Aguilar, R., Ortíz, L.A., Dinkova, T. y Sánchez de Jiménez, E. 2002. Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.

Bevan, P., 2001. Insulin signaling. *Journal of Cell Science* 8: 1429-1430.

Bewley, J.D. y Black, M. 1994. Seed: germination, structure and composition. En *Seeds. Physiology of Development and Germination*. Plenum Press New York pp 5-8.

Bewley, D. 1997. Seed germinations and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.

Blakeslee, J. J., Peer W. A. y Murphy, A. S. 2005. Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* 8:494-500.

Bove, J., Jullien, M. y Grappin, P. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 3:1002.1-1002.5

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Branco-Price, C., Kaiser, K. A., Jang, C. J. H., Larive, C. K. y Bailey-Serres, J. 2008. Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to

cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 56: 743-755.

Brant-Zawadzki, P. B., Schmid, D. I., Jiang, H., Weyrich, A. S., Zimmerman, G. A. y Kraiss, L. W. 2007. Translational control in endothelial cells. *Annual Review of Biochemistry* 60: 717-755.

Buchanan, B. Gruissem, W. y Jones, R. L. 2000. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. En *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. EUA. pp: 850-928.

Burnett, P. E., Barrow, R. K., Cohen, N. A., Synder, S. H. y Sabatini D. M. 1998. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 4240-4245.

Carroll, A. J., Heazlewood, J. L. Ito, J. y Millar, H. 2008. Analysis of the *Arabidopsis* cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. *Molecular and Cellular Proteomics* 7: 1297-1316.

Corradetti, M. N. y Guan, K-L. 2006. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 25: 6347-6360.

Crespo, J. L., Díaz-Troya, S. y Florencio, F. J. 2005. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 139: 1736-1749.

Dann, S. G., Selvaraj, A. y Thomas, G. 2007. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends in Molecular Medicine* 13: 252-259.

Dennis, P. B., Pullen, N., Pearson, R. B., Kozma, S. C. y Thomas, G. 1998. Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70s6k activation loop phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 12: 14845-14852.

Dever, T. E., 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108: 545-556.

Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C. y Meyer, C. 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Journal* 9:864-870.

Dinkova, T. D., Aguilar, R. y Sánchez de Jiménez, E. 2000. Expression of maize eukaryotic initiation factor eIF-iso4E is regulated at the translational level. *The Biochemical Journal* 351: 825-831.

Dinkova, T. D., Reyes de la Cruz, H., Garcia-Flores, C., Aguilar, R. Jiménez-García L. F. y Sánchez de Jiménez, E. 2007. Dissecting the TOR-S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation. *Physiologia Plantarum* 130: 1-10.

Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. y Chen, J. 2001. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294: 1942-1945.

Felle, H. 1988. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta* 174: 495-499.

Ferrari, S., Bannwarth, W., Morley, S. J., Totty, N. F. y Thomas, G. 1992. Activation of p70S6k is associated with phosphorylation of four clustered sites displaying Ser/Tre-

Pro motifs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89: 7282-7285.

Fingar, D. C. y Blenis, J. 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. Oncogene 23: 3151-3171.

Franco, R. y Rosenfeld, M. G. 1990. Hormonally inducible phosphorylation of a nuclear pool of ribosomal protein S6. Journal of Biological Chemistry 265: 4321-4325.

Freire, M. A., Tourneur, C., Granier, F., Camonis, J., El Amrani, A., Browning, K. S. y Robaglia, C. 2000. Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor 4E-binding protein. Plant Molecular Biology 44: 129-140.

Fumagalli, S. y Thomas, G. 2000. S6 phosphorylation and signal transduction. In: Sonenberg, N., Hershey, J. W. B. y Mathews, M. B. (eds) Translational control of gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, pp 695-717.

Gantt, J. S. y Key, J. L. 1985. Coordinate expression of ribosomal protein mRNA following auxin treatment of soybean hypocotyls. Journal of Biological Chemistry 260: 6175-6181.

García-Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M. y Sánchez de Jiménez, E. 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. The Biochemical Journal 358: 95-100.

Gingras, A. C., Raught, B. y Sonenberg, N. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Annual Review of Biochemistry 68: 913-963.

Gingras, A. C., Raught, B. y Sonenberg, N. 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes & Development* 15: 807-826.

Gout, I. J., Minami, T., Hara, K., Tsujishita, Y., Filonenko, V., Waterfield, M. D. y Yonezawa, K. 1998. Molecular cloning and characterization of a novel p70S6 kinase, p70S6 kinase beta containing a proline-rich region. *Journal of Biological Chemistry* 273: 30061-30064.

Guilfoyle, T., Hagen G., Ulmasov T. y Murfett, J. 1998. How does auxin turn on genes? *Plant Physiology* 118: 341-347.

Hagen, G. y Guilfoyle, T. 2002. Auxin-responsive gene expresión: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology* 19: 373-385.

Han, J. W., Pearson, R. B., Dennis, P. B. y Thomas, G. 1995. Rapamycin wortmanin, and the methylxantine SQ20006 inactivate p70S6k by inducing dephosphorylation of the same subset of sites. *Journal of Biological Chemistry* 270: 21396-21403.

Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A. y Pearson, R. B. 2003. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular and Cellular Biology* 23:8862-8877.

Hanks, S. K. y Hunter, T. 1995. The Protein kinase facts book. Protein Serine Kinases: The Eukaryotic Protein Kinase Superfamily (Hardie, G., and Hanks, S. K., eds.) Academic Press London pp: 7-47

Hara, K., Yonezawa, K, Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C. y Avruch, J. 1998. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 273: 14484-14494.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J. y Yonezawa, K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110: 177-189.

Hay, N. y Sonenberg, N. 2004 Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* 18:1926-1945.

Hayashi, A. A. y Proud, C. G. 2007. The Rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mTOR. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 292: E1647-E1645.

Hershey, J. W. M. 1989. Protein phosphorylation controls translation rates. *Journal of Biological Chemistry* 264: 20823-20826.

Hooper, C. 2009. Insulin signaling pathways

<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=10602&pid=7>

Imai, Y. y Clemmons, D.R. 1999. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in stimulation of vascular smooth muscle cell migration and desoxiribonucleic acid synthesis by insulin growth factor I. *Endocrinology* 140: 4228-4235.

Inoki, K., Ouyang, H., Li, Y. y Guan K. L. 2005. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69: 79-100.

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A. y Hall, M. N. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology* 6: 1122-1128.

Jefferies, H. B. J. y Thomas, G. 1996. Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, pp 389-409.

Jefferies, H. B. J., Reinhard, C., Kozma, S. C. y Thomas, G. 1994. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 4441-4445.

Joshi-Barve, S., De Benedetti, A. y Rhoads A. 1992. Preferential translation of heat shock mRNAs in HeLa cells deficient in protein synthesis initiation factor eIF-4E and eIF-4 gamma. *Journal of Biological Chemistry* 267: 21038-21043.

Jugenheimer, R. W. 1988. La planta de maíz. En *Maíz. Variedades mejoradas Métodos de cultivo y Producción de Semillas*. Ed. Limusa México 3ª Reimpresión pp:62-68.

Koh, H., Jee, K., Lee, B., Kim, J., Kim, D., Yun, Y. H., Kim, J. W., Choi, H. S. y Chung, J. 1999. Cloning and characterization of a nuclear S6 kinase, S6 kinase-related kinase (SRK); a novel nuclear target of Akt. *Oncogene* 18: 5115-5119.

Koroleva, O. A., Calder, G., Pendle, A. F., Kim, S. H., Lewandowska, D., Simpson, C. G., Jones, I. M., Brown, J. W. S. y Shaw, P. J. 2009. Dynamic behavior of *Arabidopsis* eIF4A-III, putative core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. *The Plant Cell* 21: 1592-1606.

Kozak, M. 1991. An análisis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *The Journal of Cell Biology* 115:887-903.

Kozak, M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234: 187-208.

Kozma, S. C. y Thomas G., 2002. Regulation of cell size in growth, development and human diseases: PI3K, PKB and S6K. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 24: 65-71.

Krieg, J., Hofsteenge, J. y Thomas, G. 1988. Identification of the 40S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. *Journal of Biological Chemistry* 263: 11473-11477.

Lewin, B. Protein synthesis. 2000. En *Genes VII*. Oxford University Press, New York. pp. 139-166.

Leyser, O. 1998. Plant hormones. *Current Biology* 8: R5-R7.

Li, Y., Corradetti, M. N., Inoki, K. y Guan, K. L. 2004. TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends in Biochemical Sciences* 29: 32-38.

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. y Hall, M. N. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell* 10: 457-468.

Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K. y Avruch, J. 2005. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current Biology* 15: 702-713.

Macdonald, H. 1997. Auxin perception and signal transduction. *Physiologia Plantarum* 100: 423-430.

Mahfouz, M. M., Kim, S., Delauney, A. J. y Verma, D. P. S. 2006. *Arabidopsis* target of rapamycin interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *The Plant Cell* 8: 477-490.

Martin, K. A. y Blenis, J. 2002. Coordinate regulation of translation by the PI3-kinase and mTOR pathways. *Advances in Cancer Research* 86: 1-39.

Martin, K. A. y Hall, M., N. 2005. The expanding TOR signalling network. *Current Opinion in Cell Biology* 17: 158-166.

Mathews, M. B., Sonenberg, N. y Hershey, J. W. B. 2000. Origin and principles of translational control. In *Translational control of gene expression*. Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, eds. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 1-32.

McIntosh, K. B. y Bonham-Smith, P. C. 2006. Ribosomal protein gene regulation: what about plants? *Canadian Journal of Botany* 84: 342-362.

Meijer, A. J. y Codogno, P. 2004. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36:2 445-2462.

Metz, A. M. y Browning, K. S. 1996. Mutational analysis of the functional domains of the large subunit of the isosyme form of wheat initiation factor eIF4F, *Journal of Biological Chemistry* 49: 31033-31036.

Meuwly, P. y Pilet, P. E. 1991. Simultaneous gas chromatography-mass spectrometry quantification of endogenous [12C]- and applied [13C] Indole-3yl- acetic acid levels in growing maize roots. *Plant Physiology* 95: 179-183.

Meyuhas, O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European Journal of Biochemistry/FEBS* 267: 6321-6330.

Meyuhas, O. y Hornstein, E. 2000. Translational control of TOP mRNA. En: Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. y Mathews, M.B. (eds) *Translational Control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, pp 671-693.

Moore, T. C. 1989. Auxins. En *Biochemistry and physiology of plant hormones*. Springer Verlag New York 2da edición pp 66-76.

Mora, A., Komander, D., van Aalten, D. M. y Alessi, D. R. 2004. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in cell and developmental biology* 15: 161-170.

Nygård, O. y Nilsson, L. 1990. Translational dynamics. Interactions between the translational factors, tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis. *European Journal of Biochemistry/FEBS* 191: 1-17.

Park, I, H., Bachmann, R., Shirazi, H. y Chen, J. 2002. Regulation of ribosomal S6 kinase 2 by mammalian target of rapamycin. *Journal of Biological Chemistry* 277: 31423-31429.

Pearson, R. B., Dennis, P. B., Han, J. W., Williamson, N. A., Kozma, S. C., Wettenhall, R. E. y Thomas, G. 1995. The principal target of rapamycin induced

p70S6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO Journal* 41: 5279-5287.

Pende, M., Um, S.H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S. C. y Thomas G. 2004. *S6K1^{-/-}/S6K2^{-/-}* mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology* 24: 3112-3124.

Peng, T., Golub, T. R. y Sabatini, D. M. 2002. The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Molecular and Cellular Biology* 22: 5575-5584.

Pérez, F. L., Aguilar, R. y Sánchez de Jiménez, E. 1987. Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. *Physiologia Plantarum* 69: 517-522.

Pérez, F. L., Aguilar, R., Pérez, M. A. y Sánchez de Jiménez, E. 1990. Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissues. *Plant Physiology* 94: 1270-1275.

Pérez, M. A., Aguilar, R., Briones, E. y Sánchez de Jiménez, E. 1993. Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination. *Plant Science* 94: 71-79.

Peruzzi, F., Prisco, M., Drews, M., Salmoni, P., Grassili, E., Romano, G., Calabretta, B., y Baserga, R. 1999. Multiple pathway on the insulin growth factor I receptor in protection from apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 19: 7203-7215.

Peterson, R. T. y Schreiber, S. L. 1998. Translation control: connecting mitogens and the ribosome. *Current Biology* 8: R248-R250.

Petroulakis, E., Mamame, Y., Le Bacquer, O., Shahbazian, D. y Sonenberg, N. 2006. mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *British Journal of Cancer* 94: 195-199.

Price, D. J., Mukhopadhyay, N. K. y Avruch, J. 1991. Insulin-activated protein kinases phosphorylate a pseudosubstrate synthetic peptide inhibitor of the p70S6 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 266: 16281-16284.

Proud, C. G. 2002. Regulation of mammalian translation factors by nutrients, *European Journal of Biochemistry* 269: 5338-5349.

Proud, C. G. 2007a. Signaling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *The Biochemical Journal* 403: 217-234

Proud, C. G. 2007b. mTOR, unleashed. *Science* 318: 926-927.

Quint, M. y Gray W. M. 2006. Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 448-453.

Reyes de la Cruz, H. 2004. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas (Bioquímica) "Caracterización y regulación de la cinasa de la S6 de ejes embrionarios de maíz durante la germinación". Facultad de Química UNAM.

Reyes de la Cruz, H., Aguilar, R. y Sánchez de Jiménez, E. 2004. Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70S6K. *Biochemistry* 43: 533-539.

Reinhard, C., Fernández, A., Lamb, N. J. C. y Thomas, G. 1994. Nuclear localization of p85-S6K: functional requirement for entry into S phase. *EMBO Journal* 13: 1557-1565.

Rincón-Guzmán A., Beltrán E., Ortiz A. y Sánchez de Jiménez E. 1998. Ribonucleoprotein particles of quiescent maize embryonic axes. *Plant Molecular Biology* 38: 357-364.

Roux, P. P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M. K., Cohen, M. S., Taunton, J., Sonenberg, N. y Blennis, J. 2007. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *Journal of Biological Chemistry* 282: 14056-14064.

Rutter, J., Probst, B. L. y McKnight, S. L. 2002. Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell* 111: 17-28.

Ruvinsky, I. y Meyuhas, O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in Biochemical Sciences* 31: 342-348.

Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P. y Meyuhas, O. 2005. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development* 19: 2199-2211.

Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G. y Abraham, R. T. 1995. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamicyn complex in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 270: 815-822.

Saitoh, M. N., Pullen, N., Brennan, P., Cantrell, D., Dennis, P. B. y Thomas, G. 2002. Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *Journal of Biological Chemistry* 277: 20104-20112.

Saltiel, A. R. y Kahn, C. R. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.

Sánchez de Jiménez, E. 2000. Protein synthesis in seed germination: connecting external cell signals with the ribosome. En: Black, M., Bradford, K.J. y Vázquez-Ramos J. (eds.). *Seed Biology: Advances and Applications*. CABI Publishing. Londres, pp 11-24.

Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R. y Dinkova, T. 1997. S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize. *Biochimie* 79: 187-194.

Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E. y Ortiz-López, A. 1999. Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiologia Plantarum* 105: 148-154.

Scharf, K. D., y Nover, L. 1982. Heat-shock induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* 30: 427-437.

Selman, C., Tullet, J. M. A., Wieser, D., Irvine, E., Lingard, S. J., Choudhury, A. I., Claret, M., Al-Qassab, H., Carmignac, D., Ramadani, F., Woods, A., Robinson, I. C. A., Schuster, E., Batterham, R. L., Kozma, S. C., Thomas, G., Carling, D., Okkenhaug, K., Thornton, J. M., Partridge, L., Gems, D. y Withers, D. J. 2009. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science* 326: 140-144.

Schalm, S. S. y Blenis, J. 2002. Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Current Biology* 12: 632-639.

Shah, O. J., Anthony, J. C., Kimball, S. R. y Jefferson, L. S. 2000. 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 279: E715-E729.

Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G. y Kozma, S. C. 1998. Disruption of the p70^{S6k}/p85^{S6k} gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO Journal* 17: 6649-6659.

Sotelo, R., Garrocho-Villegas, V., Aguilar, R., Calderón, M.E. y Sánchez de Jiménez, E. Coordination of cell growth and cell division in maize (*Zea mays*) relevance of the conserved TOR signal transduction pathway. *In vitro Cellular and Developmental Biology*. En prensa.

Stewart, M. J. y Thomas, G. 1994. Mitogenesis and protein synthesis: A role for ribosomal protein S6 phosphorylation? *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 16: 1-7

Tang, H., Hornstein, E., Stolovich, M., Levy, G., Livingstone, M., Templeton, D., Avruch, J. y Meyuhas O. 2001. Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation *Molecular and Cellular Biology* 21: 8671-8683.

Templeton, G. W. y Moorhead, G. B. G. 2005. The phosphoinositide-3-OH-kinase-related kinases of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal* 6: 723-728.

Thomas, G. 2002. The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth. *Biological Research* 35: 305-313.

Thomas, G., Pérez, M. M., Siegmund M. y Otto, A. M. 1982. The effect of serum EGF, PGF 2α and insulin on S6 phosphorylation and initiation of protein and DNA synthesis. *Cell* 30: 235-242.

Turck, F., Kozma, S. C., Thomas, G. y Nagy, F. 1998. A heat sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70^{S6k} function *in vivo*. *Molecular and Cellular Biology* 18: 2038-2044.

Turck, F., Zilberman, F., Kozma, S. C., Thomas, G. y Nagy, F. 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134: 1527-1535.

Volarevic, S. y Thomas, G. 2001. Role of S6 kinase in cell growth. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 65: 101-127.

Walker, L. y Estelle, M. 1998. Molecular mechanisms of auxin. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 434-439.

Wang, X. y Proud, C. G. 2006. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology* 21: 362-369.

Webster, C., Gaut, R. L., Browning, K. S., Ravel, J. M. y Roberts, J. K. M. 1991. Hypoxia enhances phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4A in maize root tips. *Journal of Biological Chemistry* 266: 23341-23346.

Williams, A. J., Werner-Fraczek, J., Chang, I. F. y Bailey-Serres J. 2003. Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips maize. *Plant Physiology* 132: 2086-2097.

Woodward, A. W. y Bartel, B. 2005. Auxin: Regulation, action and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.

Wool, I. G., Chan, Y. L., y Gluck, A. 1995. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochemistry and Cell Biology* 73: 933-947.

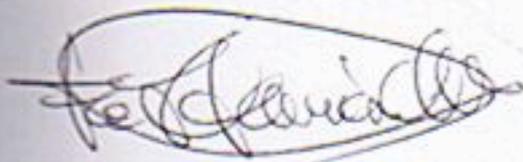
Wool, I. G. 1996. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 21: 164-165.

Wullschleger, S., Loewith, R. y Hall, M. N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.

Yang, Q, Inoki, K., Ikenoue, T. y Guan, K. L. 2006. Identification of Sin as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes and Development* 20: 2820-2832.

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "REGULACIÓN DE LA S6K POR AUXINAS E INSULINA EN RADÍCULAS DE SEMILLAS DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN" con fecha de examen el 27 de mayo del 2010.

MIEMBROS DEL JURADO

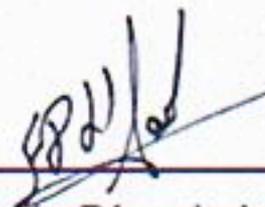


Dr. Francisco José Fernández Perrino

PRESIDENTE

Departamento de Biotecnología

UAM- Iztapalapa



Dr. Fernando Díaz de León Sánchez

SECRETARIO

Departamento de Ciencias de la Salud

UAM- Iztapalapa

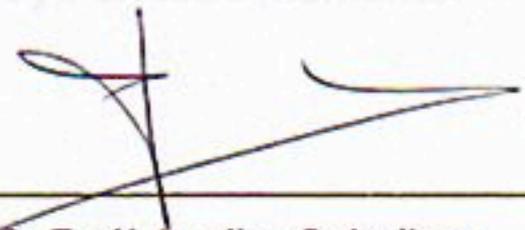


Dra. Mónica Ponce Valadez

VOCAL

Departamento de Ciencias de la Salud

UAM- Iztapalapa



M. en C. Raúl Aguilar Caballero

VOCAL

Departamento de Bioquímica

Facultad de Química UNAM